

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

**“LA HIPOXIA INDUCE LA ACTIVACIÓN DE LOS MACRÓFAGOS
POTENCIANDO LA FAGOCITOSIS Y LA PRESENTACIÓN
ANTIGÉNICA, A TRAVÉS DE LA PRODUCCIÓN DE IFN- γ ,
MEDIADA POR EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN HIF-1 α ”**

TESIS DOCTORAL presentada por
MARÍA BÁRBARA ACOSTA IBORRA

Licenciada en Biología,
Para optar al grado de Doctor.

Directores:

Dr. MANUEL ORTIZ DE LANDÁZURI
Dra. ISABEL M. OLAZABAL OLARREAGA

Madrid, Mayo de 2009

El trabajo presentado en esta Tesis Doctoral ha sido realizado en el Servicio de Inmunología del Hospital Universitario de la Princesa, bajo la dirección del Dr. Manuel O. de Landázuri y la Dra. Isabel M. Olazabal Olarreaga.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradezco a mi director de Tesis, el Dr. Manuel O. de Landázuri, el haberme dado la oportunidad de trabajar, bajo su experta dirección, en el laboratorio del Servicio de Inmunología, y el haberme facilitado una buena formación, además de ayudarme a superar todas las dificultades que han ido apareciendo a lo largo del desarrollo de esta Tesis Doctoral. También quiero agradecer, de manera muy especial, a mi co-directora de Tesis Isabel M. Olazábal, por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo bajo su amplia experiencia científica y por su gran entusiasmo, que han sido fundamentales para el desarrollo de esta Tesis Doctoral.

Sois muchos los que a lo largo de este trabajo habéis puesto vuestro granito de arena, en primer lugar me gustaría agradecer a Ainara, que ha sido mi compañera de penas y alegrías, la que "ha sufrido" todos mis nervios, pero sobretodo mi amiga. También quiero agradecer a Silvia, que nuestros caminos se juntaron en un momento de "bajón" y consiguió que la ciencia volviese a ser una ilusión. iiiMira Silvia, ya he escrito la Tesis!!!

Y ahora toca a todos "mis niños", a Esther con la que me he reído un montón, y de la que he aprendido muchos truquitos. A Coqui, mi primera compañera de penas y como me dijo una vez y se lo recuerdo en estos agradecimientos tienes Estrella. A Ángel, el manitas del laboratorio, a Alfonso, el hombre tranquilo, a Inés, que nos trae esas galletas después de comer, a Dani, un buen bromista, a Ali, y a Kostas, por darle un poco de cordura a este laboratorio, a Gloria, a Raquel, a Silvia, a Patricia, a Edu, a las "niñas" nuevas Gemma y María... y espero no dejarme a nadie, pero hemos hecho una piña con buen rollito, que ha hecho muy agradable trabajar en este laboratorio. A mis niños de los "Luises", a Marisa y a Diego, y en especial a Nuri y a Amaya, que las tengo mucho cariño, y que aunque ya estéis en el IIB, siempre seréis princesitos También me gustaría agradecer a Luis, a Julián y a M^a José, por su apoyo en este trabajo. A Toño, el sénior del New Lab, por toda la ayuda informática.

A todos los "Paco's", que sois muchísimos, pero en especial a Amalia, a Arantxa y a Javi, con los que he pasado muy buenos ratos y a Isa, que voy a decirte que no te haya dicho ya, Gracias. A toda la gente de rutina, pero en especial a Toñi, por ese desparpajo que nos ha hecho reír tanto. A la gente de Cecilia, en especial a Manu y Carlos. Y a los que ya se han ido del labo pero que también han marcado un poquito mi estancia. A Elisa, a Yoli a Salva y a Lara, que se os hecha mucho de menos por aquí.

A mis "niños" fuera de la ciencia, a Ali, a Nora y a María, mis primeras amigas que aún hoy sigo conservando. A Laura López y a Laura Regy, por volver este mundo un poco más loco y por lo tanto más divertido. A Juan y a Nuria, nuestros compañeros de viaje, y grandes amigos. A Cristina..., mi gran amiga de la facultad. A todos mis amigos de Mula, con los que me lo he pasado genial, pero en especial a Momi, que ha hecho de mi una persona mejor. A todos mis primos, pero en especial a Jose y a Patri, que formábamos un trío temible. Y a Miguel y a Paula, que aunque ya no están para ver este momento siempre los llevaré en mi corazón.

Y por último a mi Familia, a mis padres por darme siempre su apoyo, por valorarme, por quererme, sin ellos no hubiese llegado nunca a donde estoy. A mis hermanos, que siempre se han interesado por lo que hago, aunque no entendiesen nada, pero sobretodo porque al ser la pequeña "tipitessa" aunque se han metido conmigo, me ha protegido y ayudado en todo lo que he necesitado.

Y como no a mi esposo, José Luis, por estar siempre a mi lado, por apoyarme en todas las decisiones, por hacerse el fuerte cuando necesitaba apoyo, por hacerme reír cuando estaba triste, por centrarme. Cariño Te Quiero, eres lo mejor que me ha pasado. A mi hijo, José Luis, que con sus ocho meses de vida, ya ha descubierto el método científico, ensayo y error, pero sobretodo por esa sonrisa que me dedica cada vez que me ve, que hace que se me olvide todos los males.

A todos vosotros os dedico esta Tesis Doctoral, y como dijo una amiga, ya he tenido un hijo, he escrito un libro, sólo me queda...¡¡Plantar un árbol!!

ÍNDICE

<u>AGRADECIMIENTOS</u>	I
<u>ÍNDICE</u>	1
<u>RESUMEN</u>	5
<u>ABREVIATURAS</u>	9
<u>INTRODUCCIÓN</u>	13
1. INTRODUCCIÓN	15
2. HIPOXIA	15
2.1. OXÍGENO E HIPOXIA	15
2.2. RESPUESTA ADAPTATIVA A LA HIPOXIA.....	17
2.3. RUTA CANÓNICA DE HIPOXIA: MECANISMOS DEPENDIENTES DE HIF	19
2.3.1. El factor de transcripción HIF	19
2.3.2. Los sensores celulares de oxígeno	21
2.3.3. Regulación de HIF por hipoxia	24
2.3.4. Otros mecanismos de regulación de HIF	26
3. MACRÓFAGOS	27
3.1. ORIGEN DE LOS MACRÓFAGOS.....	28
3.2. FUNCIONES DE LOS MACRÓFAGOS.....	29
3.2.1. Fagocitosis	30
3.2.2. Presentación Antigénica.....	31
3.2.3. Secreción de citoquinas	32
3.3. REGULACIÓN FUNCIONAL DE LOS MACRÓFAGOS.....	33
3.4. INFLAMACIÓN MACRÓFAGOS E HIPOXIA.....	35
<u>OBJETIVOS</u>	37
<u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	41
<u>RESULTADOS</u>	51
1. CARACTERIZACIÓN DE LOS MACRÓFAGOS CULTIVADOS A BAJAS TENSIONES DE OXÍGENO	53
1.1. CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA DE LOS MACRÓFAGOS A HIPOXIA.....	53
1.2. LA ACTIVIDAD FAGOCÍTICA DE LOS MACRÓFAGOS SE POTENCIA EN HIPOXIA.....	54
1.3. LA HIPOXIA AUMENTA LA EXPRESIÓN DE LAS MOLÉCULAS DE PRESENTACIÓN ANTIGÉNICA EN LOS	

MACRÓFAGOS Y FAVORECE LA FORMACIÓN DE SINAPSIS INMUNOLÓGICAS	57
1.4. ACTIVACIÓN DE CÉLULAS T	61
1.5. LA HIPOXIA INDUCE LA PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS PRO-INFLAMATORIAS EN MACRÓFAGOS	64
2. MECANISMO DE REGULACIÓN DEL IFN-γ POR HIPOXIA.	68
2.1. LA HIPOXIA MEDIA LA PRODUCCIÓN DE IFN- γ DE MANERA HIF-1 α DEPENDIENTE	68
2.2. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL ELEMENTO DE RESPUESTA A HIPOXIA DE IFN- γ	74
2.3. EL IFN- γ INDUCIDO POR HIF-1 α EN HIPOXIA ES EL RESPONSABLE DEL INCREMENTO DE LA FORMACIÓN DE SINAPSIS INMUNOLÓGICAS PRODUCTIVAS Y EL AUMENTO DE LA CAPACIDAD FAGOCÍTICA.....	77
<u>DISCUSIÓN</u>	81
<u>CONCLUSIONES</u>	93
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	97
<u>ANEXO</u>	113

RESUMEN

Low oxygen tension areas are found in inflamed or diseased tissues where hypoxic cells induce survival pathways by regulating the hypoxia-inducible transcription factor (HIF). Macrophages are essential regulators of inflammation and, therefore, we have analyzed their response to hypoxia. Murine peritoneal elicited macrophages cultured under hypoxia produced higher levels of IFN- γ and IL-12 mRNA and protein than those cultured under normoxia. A similar IFN- γ increment was obtained with *in vivo* models using macrophages from mice exposed to atmospheric hypoxia. Our studies showed that IFN- γ induction was mediated through HIF-1 α binding to its promoter on a new functional hypoxia response element. The requirement of HIF-1 α in the IFN- γ induction was confirmed in RAW264.7 cells, where HIF-1 α was knocked down, as well as in resident HIF-1 α null macrophages. Moreover, Ag presentation capacity was enhanced in hypoxia through the up-regulation of costimulatory and Ag-presenting receptor expression. Hypoxic macrophages generated productive immune synapses with CD8 T cells that were more efficient for activation of TCR/CD3 ϵ , CD3 ζ and linker for activation of T cell phosphorylation, and T cell cytokine production. In addition, hypoxic macrophages bound opsonized particles with a higher efficiency, increasing their phagocytic uptake, through the up-regulated expression of phagocytic receptors. These hypoxia-increased immune responses were markedly reduced in HIF-1 α - and in IFN- γ -silenced macrophages, indicating a link between HIF-1 α and IFN- γ in the functional responses of macrophages to hypoxia. Our data underscore an important role of hypoxia in the activation of macrophage cytokine production, Ag-presenting activity, and phagocytic activity due to an HIF-1 α -mediated increase in IFN- γ levels.

ABREVIATURAS

Las abreviaturas corresponden a definiciones en inglés y se han mantenido para conservar la nomenclatura estándar.

APC: *Antigen-presenting cell*, Célula presentadora de antígeno.

ARNT: *Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Traslocator*, Traslocador nuclear del receptor para aril hidrocarburos.

bHLH: *Basic-helix-loop-helix*, básico hélice-vuelta-hélice.

BNIP-3: *Bcl-2 nineteen-KDa interacting protein 3*,

C-TAD: *C-terminal Transactivation Domain*, Dominio C-terminal de Transactivación.

ChIP: *Chromatin ImmunoPrecipitation*, Inmunoprecipitación de cromatina.

DMOG: *Dimethyloxaloylglycine*, Dimetiloxalilglicina.

EPAS: *Endothelial PAS protein*, Proteína PAS endotelial.

EPO: *Erythropoietin*, Eritropoyetina.

FIH: *Factor Inhibiting HIF*, Factor Inhibidor de HIF

GEMM-CFU: *Granulocyte-erithrocyte-megakariocyte-macrophage colony-forming unit*, Unidad formadora de colonias de granulocitos-eritrocitos-megacariocitos y macrófagos.

GM-CFU: *Granulocyte- macrophage colony-forming unit*, Unidad formadora de colonias de granulocitos y macrófagos.

GM-CSF: *Granulocyte -macrophage colony-stimulating factor*, Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos.

HIF: *Hypoxia-Inducible Factor*, Factor Inducible por Hipoxia.

HLF: *HIF-like Factor*, Factor similar a HIF.

HRE: *Hypoxia-Response Element*, Elemento de Respuesta a Hipoxia.

HRF: *HIF-related Factor*, Factor Relacionado con HIF.

IL: *Interleukine*, Interleuquina.

IPAS: *Inhibitory PAS Domain Protein*, Proteína Inhibitoria del Dominio PAS.

ITAM: *Immunoreceptor Tyrosine based activation motif*, Inmunoreceptor con motivos de activación en tirosina.

LAT: *Linker for Activation of T cell phosphorylation*, Vinculador de activación en células T fosforiladas.

LPS: *Lipopolisacaride*, Lipopolisacárido.

M-CFU: *Macrophage colony-forming unit*, Unidad formadora de colonias de macrófagos.

M-CSF: *Macrophage colony-stimulating factor*, Factor estimulador de colonias de macrófagos.

MHC: *Major histocompatibility complex*, Complejo principal de histocompatibilidad.

MOP: *Member of the PAS superfamily*, Miembro de la superfamilia PAS.

MTOC: *Microtubule organizing center*, Centro organizador de microtúbulos.

N-TAD: *N-terminal Transactivation Domain*, Dominio N-terminal de Transactivación.

NLS: *Nuclear Localization Signal*, Señal de Localización Nuclear.

ODD: *Oxygen- dependt Degradation Domain*, Dominio de Degradación dependiente de Oxígeno.

OVA: *Ovalbumin*, Ovoalbúmina.

PAI-1: *Plasminogen-activator inhibitor-1*, Inhibidor del Activador de Plasminógeno-1.

PAMP: *Receptor for Pathogen-associated molecular patterns*, Receptor de patrones moleculares asociadas a patógenos.

PHD: *Prolyl Hydroxylase Domain containing protein*, Proteína que contiene un dominio prolina hidroxilasa.

ROS: *Reactive Oxygen Sustance*, Sustancias Reactivas de Oxígeno.

SI: Sinapsis Inmune.

SMAC: *Supramolecular activation complex*, Complejo de activación supramolecular.

SR: *Scavenger Receptor*, Receptores limpiadores.

TCR: *T-cell antigen receptor*, Receptor para antígeno de la célula T.

TLR: *Toll-like receptor*, Receptor tipo Toll.

VEGF: *Vascular Endothelial Growth Factor*, Factor de crecimiento del endotelio vascular.

VHL: *Von Hippel-Lindau*.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

La inflamación es una respuesta protectora de los tejidos lesionados y puede originarse por distintos agentes inflamatorios como factores físicos (radiación UV, rotura ósea, cortes, quemaduras...), factores químicos (venenos, toxinas...) factores biológicos (bacterias, virus, hongos...) o inmunológicos (reacciones de hipersensibilidad).

En el proceso inflamatorio se producen áreas en las que la tensión de oxígeno está disminuida. Este proceso, también conocido como hipoxia, se debe a la oclusión que sufren los vasos sanguíneos adyacentes. En esta atmósfera hipóxica la capacidad de las células para realizar funciones dependientes de energía está comprometida, por lo que deben adaptar su metabolismo y expresión génica para su supervivencia. Esta respuesta de adaptación está mediada por el Factor Inducible por Hipoxia (HIF) (Maxwell *et al.*, 2001; Semenza, 2001).

2. HIPOXIA

2.1. OXÍGENO E HIPOXIA

El oxígeno es necesario para la existencia de los organismos aeróbicos. Un aporte adecuado de oxígeno a los tejidos de los organismos superiores es esencial para su funcionamiento, ya que el oxígeno actúa como aceptor final de electrones en la cadena respiratoria mitocondrial, siendo crítico para la conversión de los nutrientes en energía es decir, para la generación de ATP mediante la glucólisis: $C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \rightarrow 6CO_2 + 6H_2O + 36ATP$.

Además, el oxígeno actúa como sustrato de numerosos procesos enzimáticos, a concentraciones mínimas es indispensable en muchos procesos, como en el sistema de señales intracelulares (de proliferación celular y/o apoptosis), en la inmunidad, y en la defensa contra microorganismos. Sin embargo, el oxígeno también puede ser perjudicial para la célula ya que ciertos procesos biológicos generan sustancias reactivas de oxígeno (ROS), en las que se incluyen los radicales hidroxilo ($\cdot OH$), los aniones superóxido ($O_2^{\cdot -}$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que a altas dosis inducen

estrés oxidativo, causando daño a macromoléculas biológicas e incluso produciendo graves disfunciones metabólicas. Debido a esto, el control de la concentración celular del oxígeno es vital para minimizar el riesgo de daño celular, tanto por exceso como por defecto.

En organismos simples el oxígeno puede obtenerse por difusión directa, sin embargo, los organismos superiores han desarrollado un complejo sistema para asegurar la correcta homeostasis del oxígeno, tanto a nivel celular como a nivel del organismo. Así, existen órganos especializados en la captación del oxígeno, como los pulmones, y en el transporte y distribución a los tejidos, como el sistema cardiovascular. Además, existen estructuras especializadas en la detección de los niveles de oxígeno, como el cuerpo carotídeo, las arterias pulmonares o los cuerpos neuroepiteliales de las vías aéreas (Wenger, 2000).

El descenso en los niveles de oxígeno o hipoxia, pone en marcha una serie de respuestas en el organismo que permiten la adaptación a la falta de oxígeno. Si la hipoxia afecta a todas las células del organismo, por una disminución de la cantidad de oxígeno en sangre, se denomina **hipoxia sistémica**, mientras que si esta disminución de oxígeno ocurre únicamente en áreas localizadas se denomina **hipoxia local**.

La hipoxia sistémica se pone de manifiesto en situaciones patológicas, como en anemias o en patologías asociadas con la hemoglobina, en enfermedades pulmonares crónicas..., además de en situaciones no patológicas como por ejemplo, una elevada altitud geográfica.

La hipoxia local, es un poco más difícil de definir, debido a la variación de la tensión de oxígeno intrínseca de los tejidos, que oscila entre los 5-20 mmHg medidos en retina, médula ósea, o timo (Hale *et al.*, 2002; de Gooyer *et al.*, 2006; Parmar *et al.*, 2007), hasta los 70 mmHg de la mayoría de los tejidos (Erecińska and Silver, 2001; Aragonés *et al.*, 2008; Boutin *et al.*, 2008). Incluso las células que componen los tejidos están expuestas continuamente a variaciones fisiológicas de los niveles de oxígeno (Aragones *et al.*, 2009). La hipoxia local puede ser fisiológica, como en la médula ósea, en el desarrollo embrionario, en el músculo esquelético en procesos de ejercicio intenso..., o patológica, debida a una oclusión total o parcial de los vasos sanguíneos adyacentes al daño como ocurre en los focos inflamatorios, en los infartos de miocardio, en las isquemias cerebrales, y en el interior de tumores sólidos (áreas perinecróticas).

2.2. RESPUESTA ADAPTATIVA A LA HIPOXIA

Los mecanismos adaptativos orientados a superar la falta de oxígeno dependen del grado de afectación celular. En situaciones de hipoxia sistémica, se favorece que el riñón produzca una hormona denominada eritropoyetina (EPO), que promueve la maduración y proliferación de los progenitores eritroides, lo que se correlaciona con un mayor número de eritrocitos en sangre y por lo tanto, con un aumento del aporte de oxígeno a los tejidos (Jelkmann, 1992). Además, se produce una despolarización de las células glómicas del cuerpo carotídeo con la consecuente liberación de dopamina, que se correlaciona con un aumento en la frecuencia cardíaca y respiratoria (Bunn and Poyton, 1996). Así mismo, si la hipoxia es sostenida en el tiempo, el cuerpo carotídeo aumenta la producción de la proteína tirosina hidroxilasa que cataliza la síntesis de dopamina, por las células glómicas (Czyzyk-Krzeska *et al.*, 1992; Czyzyk-Krzeska *et al.*, 1994). Por otro lado, las células musculares de las arterias pulmonares se contraen, induciendo la circulación de la sangre de zonas poco oxigenadas del pulmón a zonas con una mayor concentración de oxígeno, asegurando así que los glóbulos rojos capten el oxígeno de manera óptima (Seta *et al.*, 2002) (Figura 1).

En situaciones de hipoxia local, en el mismo foco hipóxico, se ponen en marcha una serie de mecanismos que inducen los genes implicados en el metabolismo de la glucosa (Firth *et al.*, 1994; Firth *et al.*, 1995; Semenza *et al.*, 1996). Esto favorece el metabolismo anaerobio de las células, en un intento de compensar el bloqueo en la generación de ATP a nivel mitocondrial producido por la ausencia de oxígeno, y así asegurar el aporte de energía. Además, se produce un aumento del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), que actúa sobre las células endoteliales favoreciendo la formación de estructuras vasculares para recuperar el aporte del flujo sanguíneo (Semenza, 2000). En paralelo, también se inducen otros factores implicados en estos procesos de angiogénesis y vasculogénesis, como VEGF y el receptor de VEGF tipo 1 (Flt-1), el inhibidor del plasminógeno tisular-1 (PAI-1), o la endotelina-1 (Bergers and Benjamin, 2003; Semenza, 2003) (Figura 1). La mayoría de estos mecanismos adaptativos que componen la respuesta a hipoxia, están controlados por el Factor de transcripción Inducible por Hipoxia (HIF).

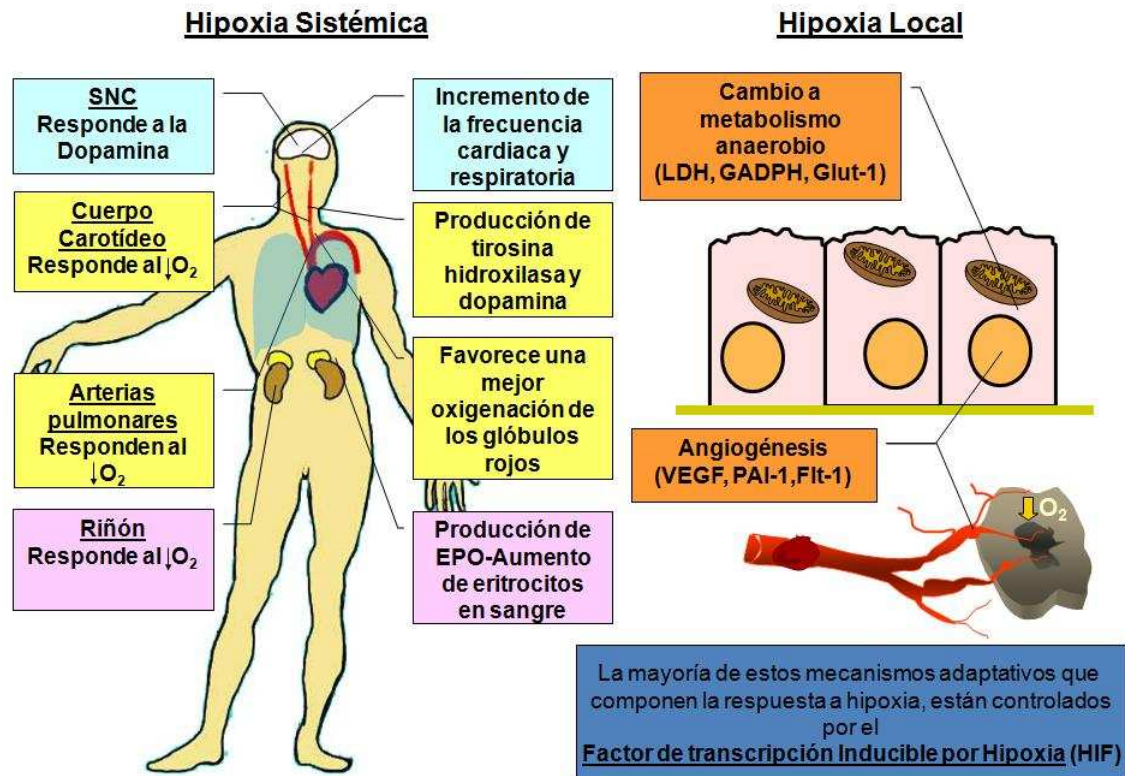


Figura 1. Respuesta adaptativa a la hipoxia. Procesos fisiopatológicos regulados por la hipoxia, respuesta celular a la hipoxia sistémica y a la hipoxia localizada.

Existen otros mecanismos independientes de HIF, que también se activan en respuesta a cambios en la tensión de oxígeno celular, como:

- El flujo a través de canales iónicos (Conforti and Millhorn, 1997; Lopez-Barneo *et al.*, 1997; Lopez-Barneo *et al.*, 1999), como el que ocurre en los canales de potasio de las células glómicas del cuerpo carotídeo.
- La activación de diferentes cascadas de quinasas como:
 - La ruta de las MAP Kinasas. Se ha descrito que ERK se activa por hipoxia en numerosos tipos celulares (Muller *et al.*, 1997; Conrad *et al.*, 1999; Conrad *et al.*, 2000; Minet *et al.*, 2000).
 - JNK y p38 (*Kinasas de stress*) (Seko *et al.*, 1997; Yin *et al.*, 1997; Chihab *et al.*, 1998; Laderoute *et al.*, 1999).
 - La ruta de las PI3 Kinasas (Alvarez-Tejado *et al.*, 2001) que se activa en líneas celulares de hepatocitos (Hep 3B) y neuronales (PC12).
- Las especies reactivas de oxígeno (ROS). Los ROS, que actúan como transductores de señales, podrían regularse según la concentración de oxígeno en el ambiente, ya que el oxígeno es el principal componente de estas

moléculas. Sin embargo, existe una gran controversia respecto a si la hipoxia promueve una disminución o un aumento de los ROS (Chandel *et al.*, 1998; Vaux *et al.*, 2001).

- La activación de diversos factores de transcripción como los miembros de la familia AP-1 (c-Jun y/o c-Fos) (Ruppec and Baeuerle, 1995; Alfranca *et al.*, 2002).

2.3. RUTA CANÓNICA DE HIPOXIA: MECANISMOS DEPENDIENTES DE HIF

2.3.1. El factor de transcripción HIF

En las células eucariotas existe toda una compleja maquinaria molecular implicada en detectar los niveles celulares de oxígeno, ya que, las células dependen de éste para su supervivencia. Esta maquinaria se ha mantenido evolutivamente conservada y está presente en la mayoría de los tipos celulares que se han estudiado. La respuesta mejor caracterizada y más universal ante situaciones de hipoxia, es la activación de los factores de transcripción HIF (Semenza *et al.*, 1991; Ke and Costa, 2006). Estos factores, controlan la inducción dependiente de oxígeno de numerosos genes, uniéndose de manera específica a los elementos de respuesta a hipoxia (HRE), presentes en sus promotores.

El factor de transcripción HIF es un heterodímero formado por una subunidad α (120 kDa) y otra β (91-94 kDa), también conocida como ARNT (Traslocador nuclear del receptor para aril hidrocarburos). Es un miembro de la familia de los factores de transcripción *basic helix-loop-helix* (bHLH)-PAS. Su región N-Terminal está evolutivamente conservada y presenta un dominio bHLH y otro dominio PAS (de alta homología con los factores **Per**, **ARNT**, **Sim**) (Wang *et al.*, 1995) (Figura 2), implicados tanto en la heterodimerización entre los miembros de la familia, como en la unión al DNA a través de residuos básicos presentes en su secuencia (Jiang *et al.*, 1996). Además, presentan secuencias de localización nuclear (NLS) en ambos extremos. La subunidad α presenta dos dominios de transactivación, uno en posición N-terminal (N-TAD) y otro en posición C-terminal (C-TAD), mientras que la subunidad β sólo presenta un dominio de transactivación (TAD) situado en su extremo C-Terminal. Así mismo, la subunidad α presenta un dominio de degradación dependiente de oxígeno

(ODD) que se encuentra solapando con N-TAD, y que media la estabilidad de HIF de una manera oxígeno dependiente (Pugh *et al.*, 1997). Por otro lado, el C-TAD interactúa con el coactivador p300/CBP favoreciendo así la transcripción génica (Lando *et al.*, 2002a).

Existen tres tipos de subunidades α :

- HIF-1 α
- HIF-2 α o EPAS
- HIF-3 α

Están codificadas por distintos genes y presentan una expresión diferencial en tejido (Wenger, 2002).

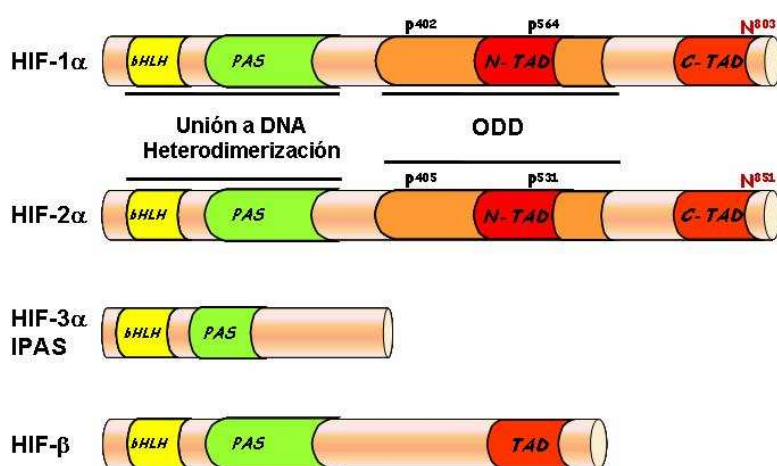


Figura 2. Dominios estructurales de HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α y HIF- β . Las cuatro proteínas presentan el dominio bHLH-PAS, que es el responsable de la heterodimerización y la unión al DNA. Todas, excepto HIF-3 α , presentan dominios de transactivación (TAD).

HIF-1 α se expresa de manera ubicua en humano y ratón, y hasta la fecha se han descrito varias isoformas de HIF-1 α (Lee *et al.*, 2004), algunas de las cuales funcionan como dominantes negativos (Chun *et al.*, 2001; Lukashev *et al.*, 2006).

HIF-2 α o EPAS (proteína PAS endotelial) (Ema *et al.*, 1997), a la que también se denomina HLF (Factor similar a HIF), HRF (Factor Relacionado con HIF) o MOP2 (Miembro de la superfamilia PAS), se expresa en tejido de manera más restringida que HIF-1 α . A nivel de proteína presenta un 48% de homología con HIF-1 α , compartiendo similitudes estructurales y bioquímicas como, la estabilización por hipoxia, la heterodimerización con HIF- β y la unión a regiones similares en el DNA. Sin embargo, a pesar de ser tan parecidos no existe redundancia génica, ya que deficiencias en cada uno de estos factores son letales en el estado embrionario del ratón (Kotch *et al.*, 1999; Compennolle *et al.*, 2002).

HIF-3 α se expresa en gran variedad de tejidos (Gu *et al.*, 1998). Presenta varias isoformas de procesamiento alternativo, pero todas tienen en común la falta del dominio transactivador por lo que actúan como reguladores negativos en la expresión de genes inducidos por HIF. Una de las variantes más estudiada es IPAS (Makino *et al.*, 2001), que se une al extremo N-terminal de HIF-1 α evitando que este se una al DNA y por lo tanto actuando como dominante negativo. Además, se sabe que IPAS se induce por hipoxia, por lo que se fomenta un bucle de retroalimentación negativa para controlar la actividad de HIF-1 α (Makino *et al.*, 2002; Heidbreder *et al.*, 2003).

2.3.2. Los sensores celulares de oxígeno

El estudio de la homeostasis del oxígeno ha permitido definir varios mecanismos moleculares en las células de mamíferos, que cooperan con las estructuras especializadas (cuerpo carotídeo, arterias pulmonares...), en detectar los niveles de oxígeno a nivel sistémico (Wenger, 2000).

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) pueden regular respuestas específicas a hipoxia (Chandel *et al.*, 1997; Chandel *et al.*, 1998) aunque su papel es bastante controvertido (Srinivas *et al.*, 2001; Vaux *et al.*, 2001).

Con el descubrimiento de la proteína VHL (Von Hippel-Lindau) se empezó a establecer un nuevo mecanismo molecular en la regulación de HIF en respuesta a hipoxia, en el cual VHL interacciona con un HIF modificado post-traducionalmente para ser degradado. Esta modificación post-traducional consiste en la hidroxilación de dos residuos específicos de prolina, y está catalizada por unas enzimas **prolil hidroxilasas (PHD)** que actualmente se consideran los sensores de oxígeno por excelencia.

Las PHD son enzimas dependientes de O₂, y se han implicado directamente en la degradación de HIF (Bruick and McKnight, 2001; Epstein *et al.*, 2001). Constituyen una nueva familia de dioxigenasas dependientes de hierro (II) y 2-oxoglutarato (Hirsila *et al.*, 2003), pero son independientes de la otra familia de dioxigenasas, las hidroxilasas del colágeno, de hecho, ensayos *in vitro* demuestran que HIF no se hidroxila por las hidroxilasas de colágeno y sí por las PHDs.

En mamíferos se han clonado 4 isoformas diferentes de las prolil hidroxilasas, que se denominan PHD o EGLN por su alta homología con unas enzimas similares descritas en *C. Elegans* (Epstein *et al.*, 2001). Presentan alta homología en la región C-terminal, pero difieren sustancialmente en la región N-terminal (Villar *et al.*, 2007). Dentro de las secuencias conservadas destaca un barril β que conforma el bolsillo catalítico, en donde 2 residuos de histidina y 1 de aspártico, están implicados en la

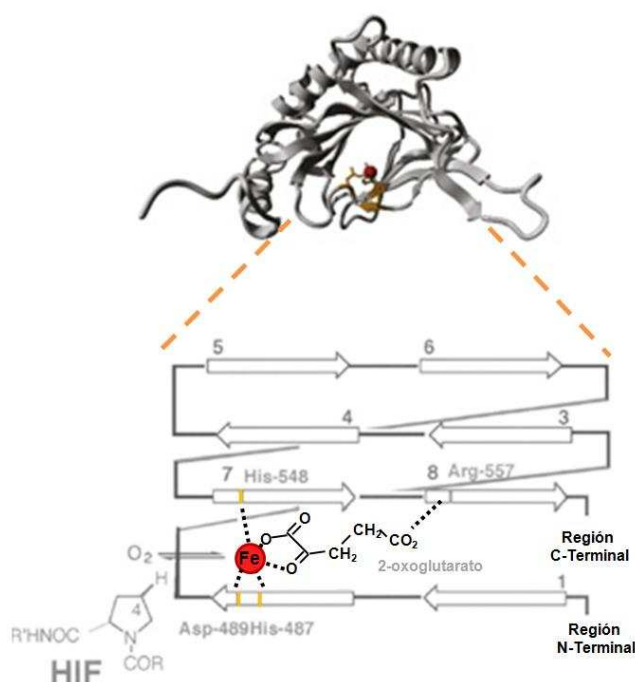


Figura 3. Detalle del centro catalítico de las PHDs.

Las PHDs tienen una localización subcelular diferente, siendo la PHD-1 predominantemente nuclear, frente al patrón citosólico que presenta la PHD-2, mientras que la PHD-3 presenta un patrón mixto (Metzen *et al.*, 2003). La PHD-4 (P4H-TM) por el contrario se encuentra localizada en la membrana del retículo endoplasmático, orientada hacia el lumen (Koivunen *et al.*, 2007), de manera similar a las hidroxilasas de colágeno. Además, mediante ensayos inmunohistoquímicos en muestras de tejidos humanos, se observó un patrón de expresión específico de tejido para cada PHD (Soilleux *et al.*, 2005). Por lo tanto, cada uno de los miembros de la familia de las PHDs podrían ejercer diferentes funciones en la homeostasis del oxígeno, y coordinar una respuesta adaptativa a la falta de oxígeno.

Los niveles de proteína de PHD1 y PHD3 se controlan vía E3 ubiquitina ligasa-Siah2, que las marca para degradar vía proteosoma (Nakayama *et al.*, 2004; Nakayama *et al.*, 2007). Además, la hipoxia produce un incremento de los niveles de RNA mensajero de la PHD2 y de la PHD3 mientras que la PHD1 se mantiene

constante (del Peso *et al.*, 2003) lo que sugiere que la falta de oxígeno regula a estas enzimas, tanto negativamente a nivel de actividad, si no hay oxígeno no pueden hidroxilar a HIF, como positivamente en la cantidad de enzima disponible. Análisis realizados con RNAs de interferencia frente a cada una de las PHDs, presentan a la PHD-2 como la principal responsable de la degradación de HIF-1 (Berra *et al.*, 2003).

Existe un interés generalizado en determinar la importancia de cada una de las prolin hidroxilasas en la regulación de HIF en el organismo. En este sentido, se han creado ratones transgénicos en los que se ha silenciado cada una de las PHDs.

- PHD-1^{-/-}: Son ratones que están protegidos frente a isquemia, ya que consumen menos oxígeno porque tienen menos actividad mitocondrial y por lo tanto, generan menos especies reactivas de oxígeno (Aragonés *et al.*, 2008).
- PHD-2^{-/-}: Estos ratones mueren entre los días 12,5-14,5 de vida embrionaria por defectos severos tanto en la placenta como en el corazón (Takeda *et al.*, 2006). Por eso, se diseñaron ratones en los que se podía eliminar específicamente PHD-2 en el corazón, pulmón, hígado y riñón de ratones adultos, lo que causaba un aumento en el número y tamaño de los vasos sanguíneos en dichos tejidos (Takeda *et al.*, 2008).
- PHD-2^{+/-}: Estos ratones se caracterizan por presentar una inducción de los niveles renales de eritropoyetina y desarrollar policitemia (Minamishima *et al.*, 2008; Takeda *et al.*, 2008).
- PHD3^{-/-}: Estos ratones no presentan defectos aparentes (Berra *et al.*, 2006; Takeda *et al.*, 2006; Takeda *et al.*, 2008). Sin embargo, el doble mutante PHD2^{-/-}/ PHD3^{-/-}, desarrolla una eritrocitosis moderada (Takeda *et al.*, 2008).

El descubrimiento de las PHDs aportó un mecanismo según el cual variaciones en la concentración de oxígeno podrían traducirse en cambios en la expresión génica dependiente de HIF. Estudios en la constante de afinidad (K_m) de las PHDs, indican que ésta se encuentra próxima a la concentración de oxígeno atmosférico (Hirsila *et al.*, 2003), de tal forma que se ven afectadas por pequeños cambios en la disponibilidad del mismo (Bruick, 2003), cumpliendo así con los requisitos para actuar como sensores de oxígeno.

Existe otra dioxigenasa dependiente de oxígeno, hierro y 2-oxoglutarato denominada Factor Inhibidor de HIF (FIH) (Hewitson *et al.*, 2002; Lando *et al.*, 2002a) que se

encarga de hidroxilar un residuo de asparagina presente en el dominio de transactivación C-TAD de HIF, regulando así su actividad transcripcional (Mahon *et al.*, 2001). FIH presentan una mayor afinidad por el O₂ que las PHDs, por lo que se mantiene activa a tensiones de O₂ en las que las PHDs ya han perdido su actividad. Esto permite a las células responder a los distintos grados de hipoxia y ajustar así su respuesta a la hipoxia (Aragones *et al.*, 2009).

2.3.3. Regulación de HIF por hipoxia

El proceso de activación de HIF requiere la estabilización de la proteína así como su activación transcripcional. La estabilidad de HIF dependiente de los niveles de oxígeno es la ruta de regulación mejor estudiada.

Hay que tener en cuenta que la expresión de los RNA mensajeros tanto de la subunidad α como de la subunidad β que conforman el factor de transcripción HIF, así como los niveles de proteína de la subunidad β , no se ven afectados por los niveles de oxígeno y se expresan de manera constitutiva. Sin embargo, los niveles de proteína de la subunidad α están finamente regulados por los niveles de oxígeno.

2.3.3.1. Estabilidad de HIF- α

En normoxia la subunidad HIF- α es muy inestable, tiene una vida media de unos 5 minutos antes de ser ubiquitinada y degradada vía proteosoma. Sin embargo, en condiciones de hipoxia esta vida media se ve fuertemente incrementada (Huang *et al.*, 1996). Existen dos regiones, dentro del dominio de degradación dependiente de oxígeno (ODD) de HIF- α , que son hidroxiladas por las prolil-hidroxilasas (PHD) en los residuos 402 y 564 de prolina en el caso de HIF-1 α (405 y 531 en el caso de HIF-2 α) y reconocidas por el complejo VHL-E3 ubiquitina ligasa (Kamura *et al.*, 1999; Jaakkola *et al.*, 2001). Estas regiones son independientes y no redundantes en la regulación de HIF. Ambos sitios contienen un núcleo común LXXLAP (Landazuri *et al.*, 2006), pero difieren en el resto de la secuencia y en las condiciones en las que se unen el complejo VHL-E3 ubiquitina ligasa (Masson *et al.*, 2001).

En normoxia las subunidades HIF- α son hidroxiladas en los dos residuos específicos de prolina por las PHDs. Esta modificación post-traducciona a hidroxiprolinas permite

el reconocimiento y unión de la proteína VHL, que poliubiquitina a HIF- α marcándolo para su posterior degradación vía proteosoma (Hon *et al.*, 2002; Min *et al.*, 2002). La degradación de HIF- α puede tener lugar tanto en el núcleo como en el citoplasma (Berra *et al.*, 2001) (Figura 4). Sin embargo, en hipoxia, al no haber suficiente oxígeno, las PHDs no pueden realizar su función y VHL no puede ubiquitinar a la subunidad HIF- α , por lo que ésta se acumula, se transloca al núcleo y heterodimeriza con la subunidad HIF- β formando un complejo activo que se une a los elementos de respuesta a hipoxia (HRE) en los promotores de los genes diana de HIF. Curiosamente, entre estos genes diana se encuentran las PHDs, que se encargan de restablecer los niveles de HIF cuando las tensiones de oxígeno vuelven a la normalidad (Figura 4).

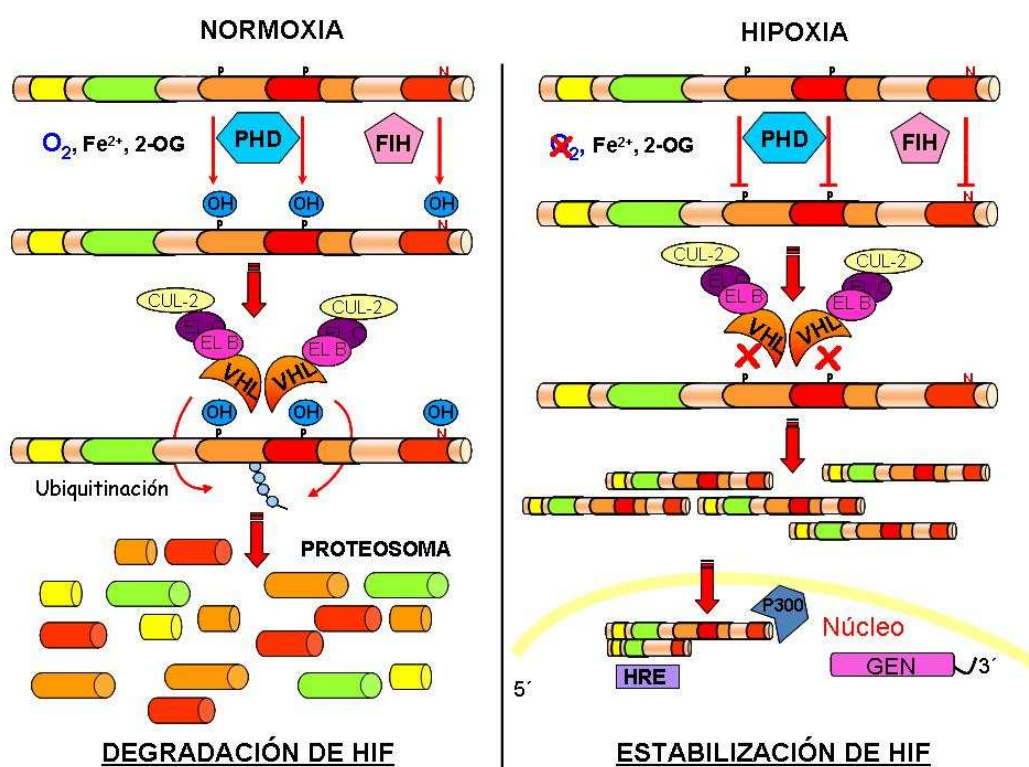


Figura 4. Ruta canónica de la regulación de HIF. En presencia de oxígeno HIF- α es hidroxilado en 2 prolinas (P) por las PHDs, y en una asparagina (N) por FIH. VHL se une a las hidroxiprolinas y ubiquitina a HIF- α , marcándolo para su degradación por el proteosoma. Si alguna molécula escapa a la degradación y viaja al núcleo, la hidroxilación en la asparagina impide la unión con p300/CBP, impidiendo su activación transcripcional. En Hipoxia, la actividad de las PHDs y FIH se encuentra comprometida por la falta de oxígeno, por lo que VHL no ubiquitina a HIF- α , y este se acumula y dimeriza con la subunidad β , pasando al núcleo, donde ahora si se une a p300/CBP e induce la transcripción de sus genes diana.

2.3.3.2. Actividad transcripcional de HIF

La actividad transcripcional es otro paso clave en la regulación de la actividad de HIF, en este sentido, como ya se ha descrito, la subunidad HIF- α posee dos dominios de transactivación, de los cuales el C-TAD está altamente conservado y es esencial para la activación de genes dependientes de HIF. Estudios estructurales demuestran la unión del dominio C-TAD de HIF con el dominio C1 de p300 o de CBP. Tanto p300, como CBP, son proteínas homologas que funcionan como coactivadores de muchos factores de transcripción por su actividad histona acetiltransferasa (modulan la estructura de la cromatina, facilitando el acceso y aumentando la actividad transcripcional) y su capacidad de reclutar la maquinaria basal.

La unión de HIF con p300/CBP está regulada por la hidroxilación de un residuo de asparagina, en posición 803 para HIF-1 α (851 para HIF-2 α), que está catalizado por FIH (Mahon *et al.*, 2001; Lando *et al.*, 2002a; Lando *et al.*, 2002b). Así, en normoxia, la asparagina se encuentra hidroxilada e impide la unión de p300/CBP al C-TAD de HIF, de modo que si alguna molécula de HIF se hubiera escapado a la degradación, ésta no sería funcional, con lo que se asegura un segundo control negativo de HIF en normoxia. Sin embargo, en ausencia de oxígeno FIH se encuentra inhibido, por lo que HIF puede interaccionar con el coactivador p300/CBP promoviendo así la transcripción de sus genes diana (Figura 4).

2.3.4. Otros mecanismos de regulación de HIF

HIF- α se puede inducir alternativamente por estímulos **no** hipóxicos como factores de crecimiento (EGF, FGF2) (Richard *et al.*, 2000; Shi *et al.*, 2007) hormonas (Insulina, IGF-1, angiotensina II, trombina) (Zelzer *et al.*, 1998; Gorlach *et al.*, 2001; Page *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2005; Page *et al.*, 2008), así como factores pro-inflamatorios como el LPS, el TNF- α y la IL-1 β (Jung *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2003b; Blouin *et al.*, 2004; Qian *et al.*, 2004). La mayoría de estos estímulos induce la ruta PI3Kinasa-AKT-mTOR así como la cascada de las MAPKinasas, que tienen un efecto sobre HIF tanto en un aumento en su actividad transcripcional (Semenza, 2002), como en el aumento del RNA mensajero y por lo tanto de proteína, lo que provoca una saturación del sistema de degradación por las PHDs, por lo que HIF no se degrada, dimeriza con la subunidad β , y viaja al núcleo para inducir sus genes dependientes (Figura 5).

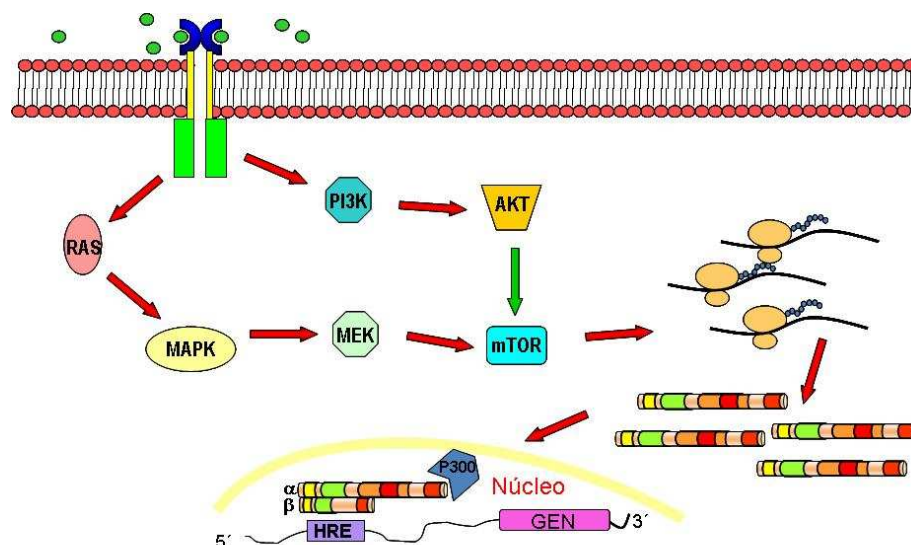


Figura 5. Regulación de HIF en normoxia. A través de la ruta de PI3K y de las MAPK, se produce una inducción del RNA mensajero de HIF- α , que se estabiliza y se une al DNA induciendo la transcripción de sus genes diana.

Estudios previos, han demostrado que HIF- α está incrementada en células inflamatorias de heridas, articulaciones artríticas, placas de ateroma, tumores. Todos estos datos establecen una posible unión entre inflamación, hipoxia y respuesta inmune, que aun no ha sido bien estudiada.

3. MACRÓFAGOS

Los macrófagos son efectores principales del sistema inmune innato, e intervienen de forma muy importante en las interacciones bidireccionales entre la inmunidad innata y la adaptativa realizando sus funciones de fagocitosis, secreción de citoquinas, presentación antigénica y remodelación de tejido. Regulan diferentes procesos de inflamación en infecciones, en articulaciones artríticas, en el desarrollo de placas de ateroma. Además, son necesarios para el mantenimiento de la homeostasis del organismo (eliminación de células apoptóticas, reparación celular...) y han sido implicados en angiogénesis de tumores y de heridas.

3.1. ORIGEN DE LOS MACRÓFAGOS

Todas las células del sistema inmunitario tienen un origen celular común en la médula ósea a partir del cual se diferencian y maduran siguiendo un proceso conocido como hematopoyesis. En un primer momento las interleuquinas IL-1, IL-3 e IL-6 inducen una división desigual (heteromitosis) de la célula progenitora que da lugar a una nueva célula progenitora y a una célula pluripotente mieloide llamada GEMM-CFU (Unidad formadora de colonias de granulocitos, eritrocitos, megacariocitos y macrófagos). Este precursor da lugar a una célula más especializada denominada GM-CFU (Unidad formadora de colonias de granulocitos y macrófagos), que gracias a la IL-3, al GM-CSF (Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos) y al M-CSF (Factor estimulador de colonias de macrófagos) da lugar al precursor monocítico M-CFU, que madura en forma de monoblasto y promonocito, que da lugar a los monocitos (Valledor *et al.*, 1998) (Figura 6).

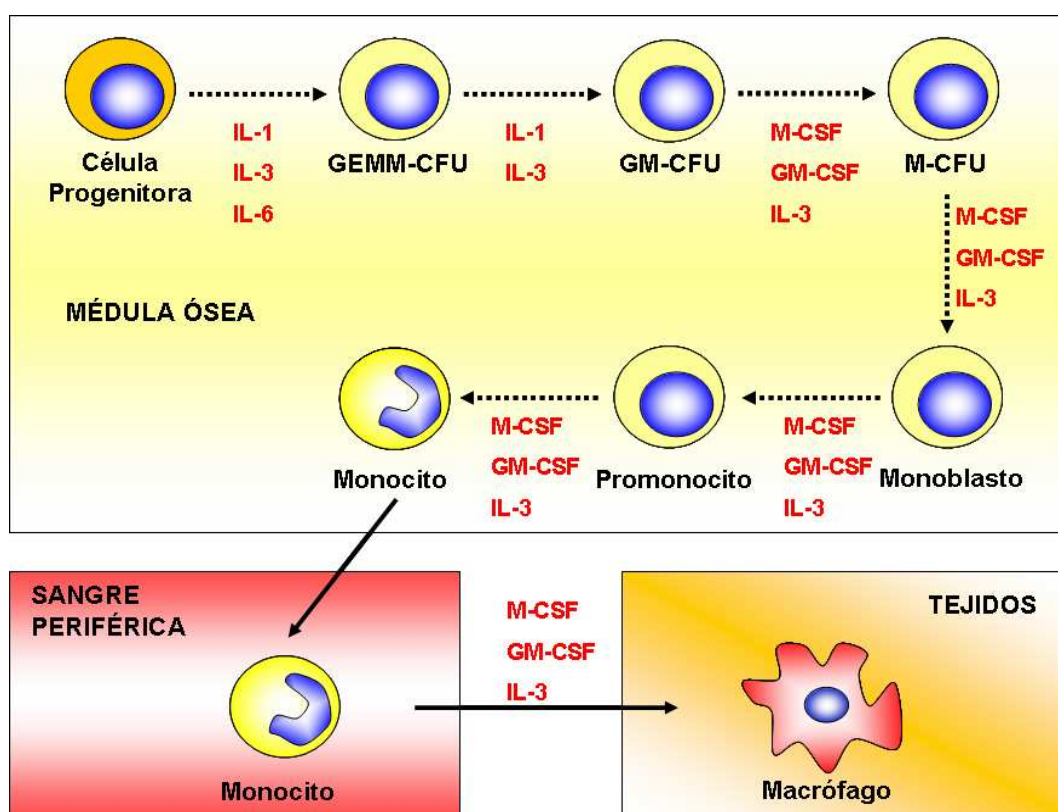


Figura 6. Proceso de diferenciación del macrófago. Diferenciación desde la célula progenitora hasta el macrófago (Valledor *et al.*, 1998).

En el tejido, el monocito madura adquiriendo la morfología y bioquímica propia de un macrófago, incrementando su contenido lisosomal y de enzimas hidrolíticas, también

aumentan el número y tamaño de las mitocondrias y por lo tanto, mejoran su metabolismo energético, además su capacidad fagocítica se encuentra favorecida (Valledor *et al.*, 1998). La vida media de los macrófagos en los tejidos puede ser muy larga (meses e incluso años), y su función y morfología depende del tejido en el que se halle, así encontramos osteoclastos en el hueso, células de kupffer en el hígado, microglía en el sistema nervioso, macrófagos alveolares en los pulmones, histiocitos en el tejido conjuntivo... (Figura 6). Estos macrófagos tisulares mantienen cierta capacidad proliferativa en respuesta a M-CSF (Celada and Maki, 1992) pero a diferencia de otras células del sistema inmune, los estímulos como citoquinas, agentes pro-inflamatorios o patógenos, detienen esta proliferación e inducen la activación del macrófago, potenciando así sus funciones específicas (Frantz *et al.*, 2005). Por el contrario, en ausencia de estímulos los macrófagos mueren por apoptosis (Xaus *et al.*, 2001) (Figura 7).

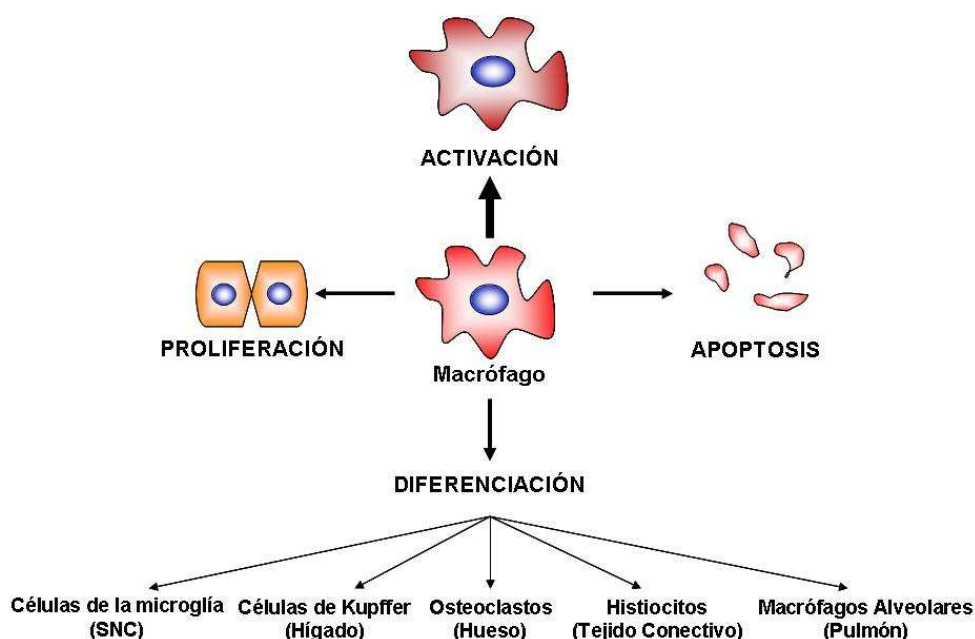


Figura 7. Decisiones de los macrófagos. En función de los estímulos que recibe, el macrófago tisular puede proliferar, diferenciarse hacia células de tejido más especializadas, activarse o si no recibe ningún estímulo, morir por apoptosis.

3.2. FUNCIONES DE LOS MACRÓFAGOS

Los macrófagos participan tanto en la inmunidad innata como en la inmunidad adaptativa, reconocen y fagocitan, limpiando así el organismo tanto de patógenos como de cuerpos apoptóticos. Además, modulan la respuesta inmune mediante la

secreción de citoquinas y la presentación antigénica a células T, dirigiendo así su activación y diferenciación.

Los macrófagos se encuentran en disposición de realizar una serie de funciones sin necesidad de ningún tipo de estímulo, como la fagocitosis, aunque muchas de estas funciones pueden realizarse con mayor eficiencia tras el estímulo de activación, mientras que para poder llevar a cabo otras funciones se requiere que el macrófago haya sido activado previamente.

3.2.1. Fagocitosis

Los macrófagos son fagocitos profesionales, capaces de internalizar partículas extrañas, como microorganismos o macromoléculas. Además, ejercen una función homeostática mediante la fagocitosis de tejido apoptótico, dañado o necrótico, que es vital para la supervivencia del organismo y ocurre de manera independiente al sistema inmune, ya que, por lo general, no activan al macrófago a la inducción de mediadores del sistema inmune. Los receptores implicados en estos procesos de limpieza incluyen los receptores scavenger o limpiadores (SR), el receptor de trombospondina, receptores de integrinas... (Erwig and Henson, 2007), que no inducen la transcripción de genes de citoquinas, o bien inducen señales y/o citoquinas inhibitorias (Erwig and Henson, 2007; Mosser and Edwards, 2008).

Los macrófagos expresan gran variedad de receptores en membrana que participan en la fagocitosis de microorganismos externos y que detectan las señales endógenas de peligro, lo que hace que sean unos de los principales "sensores de peligro" en el organismo. En una fase temprana de infección, la captación de antígeno está mediada por receptores de patrones moleculares asociadas a patógenos (PAMPs), entre los que se encuentran los receptores de manosa, de las lectinas tipo-C y los receptores tipo Toll (TLR), que han sido implicados en la fagocitosis de bacterias así como de células apoptóticas (Kindberg *et al.*, 1990; Takahara *et al.*, 2004; Burgdorf *et al.*, 2006). En una fase más tardía entran en juego receptores que unen partículas opsonizadas, entre estos receptores se encuentran los receptores Fc γ que reconocen el fragmento Fc de las inmunoglobulinas y los receptores de complemento (CR), que reconocen productos de activación del complemento, como C3b que detecta células microbianas.

La fagocitosis es un fenómeno crucial en la eliminación de patógenos, además, sirve de puente para la inmunidad adaptativa, mediante el posterior procesamiento y presentación de antígeno a células T CD4⁺ y CD8⁺. (Pfeifer *et al.*, 1993; Pozzi *et al.*, 2005)

3.2.2. Presentación Antigénica

Los macrófagos modulan la presentación antigénica a células T CD4⁺ y CD8⁺ (Hsieh *et al.*, 1993; Nair *et al.*, 1995; Pozzi *et al.*, 2005). Son células presentadoras de antígeno (APC) que presentan péptidos específicos, a través del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) (Kovacs-Bankowski and Rock, 1994), para su reconocimiento por células T, y así amplificar la señal ya que éstas secretan citoquinas y se expanden clonalmente.

Durante la formación de los conjugados macrófago-célula T específica, en el sitio de contacto, ocurre la relocalización de los receptores encargados del reconocimiento, moléculas de adhesión celular y moléculas de señalización formando lo que se denomina la sinapsis inmune (SI) (Dustin *et al.*, 1998; Monks *et al.*, 1998; Olazabal *et al.*, 2008).

El receptor para antígeno de la célula T (TCR), que es el encargado de reconocer el antígeno unido al MHC de la célula presentadora, es un complejo multimérico que se compone de cadenas $\alpha\beta$, responsables de la especificidad de reconocimiento, asociadas de forma no covalente a las cadenas CD3- γ - δ - ϵ y a las cadenas ζ del TCR (Figura 8). Además, junto con las moléculas estimuladoras, como CD2 y CD28 (Lenschow *et al.*, 1996), y las moléculas de señalización (Lck, Fyn, PKC θ), forman uno de los dos principales dominios funcionales de la SI, denominado complejo central de activación supramolecular (cSMAC), que es el encargado de transmitir la señal necesaria para la estimulación completa de la célula T. Por el contrario el complejo periférico de activación supramolecular (pSMAC) incluye moléculas de adhesión y del citoesqueleto como LFA-1 y Talina (Monks *et al.*, 1998; van der Merwe, 2002; Rey *et al.*, 2007) que estabilizan y favorecen la unión célula-célula.

En las células T, la ocupación del TCR produce la activación de proteínas tirosina quinasa de la familia de Src (Fyn, Lck), que se encargan de fosforilar los residuos de tirosina presentes en las secuencias ITAM (Inmunoreceptor con motivos de activación

en tirosina) de la región citoplasmática de las cadenas CD3 y de TCR ζ (Figura 8). Esto favorece el reclutamiento de proteínas con dominios SH2, como las tirosinas quinasas de la familia Syk (ZAP70, Syk), que reconocen los ITAM fosforilados, y que a su vez son fosforiladas por las quinasas Src, activándose y fosforilando a proteínas adaptadoras como el vinculador de activación en células T (LAT), VAV, SLP-76 y PKC θ (van Oers *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1998; Altman *et al.*, 2000; Dustin and Cooper, 2000; Sun *et al.*, 2000), iniciándose así una cascada de señalización a través de un complejo sistema de interacciones. Además, es necesario que el centro organizador de microtúbulos (MTOC) se reoriente para una eficiente secreción de gránulos y citoquinas desde el aparato de Golgi (Kupfer *et al.*, 1994) (Figura 8). La reorientación del MTOC está regulada por diferentes quinasas como Lck y ZAP70, que

fosforilan la α -tubulina necesaria en la polimerización de los microtúbulos (Huby *et al.*, 1995; Marie-Cardine *et al.*, 1995; Lowin-Kropf *et al.*, 1998; Blanchard *et al.*, 2002; Sancho *et al.*, 2002; Martin-Cofreces *et al.*, 2006).

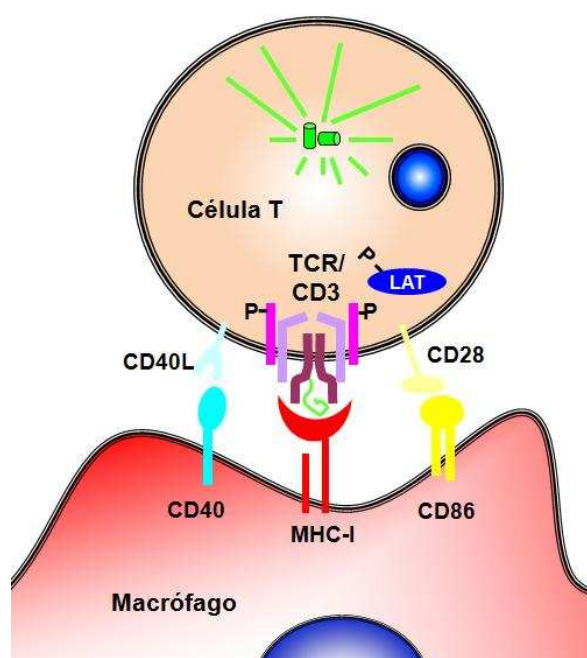


Figura 8. Sinapsis Inmune. El reconocimiento de antígeno presentado por una célula APC, por la célula T, promueve una serie de sucesos entre los que se incluye el cambio conformacional de CD3 ϵ , la fosforilación de CD3 ζ y de LAT y la traslocación del MTOC al sitio de contacto.

Estas y otras vías que se ponen en marcha tras la activación del linfocito T, llevan a la activación transcripcional de diversos genes como IL-2 e IFN- γ (Crabtree, 1989), que actuarán de manera autocrina favoreciendo la expansión clonal.

3.2.3. Secreción de citoquinas

Los macrófagos activados producen citoquinas como IL-12, IL-18, IFN- γ , TNF- α , IL-1, que promueven el reclutamiento de otras células inflamatorias, como linfocitos y neutrófilos, y son responsables de la mayor parte de los efectos sistémicos de la inflamación. Al mismo tiempo, estas citoquinas pueden actuar de manera autocrina

sobre los macrófagos incrementando su función fagocítica, y su capacidad de presentación antigénica a linfocitos CD4+ y CD8+.

Finalmente, los macrófagos también producen factores de crecimiento para fibroblastos (FGF, TGF- β) y para el endotelio vascular, de manera que se favorece el riego sanguíneo y la reparación de tejidos dañados. No obstante, estos factores de crecimiento también han sido implicados en la vascularización de los tejidos sólidos y de los tumores.

3.3. REGULACIÓN FUNCIONAL DE LOS MACRÓFAGOS

La activación de los macrófagos es un proceso complejo y altamente regulado, que consiste en una serie de modificaciones morfológicas, bioquímicas y funcionales que culminan en el aumento del potencial de la célula para ejercer funciones efectoras.

Los agentes más potentes en la activación de los macrófagos son el IFN- γ y el lipopolisacárido (LPS), aunque también otros agentes como el GM-CSF, M-CSF, IL-1, IL-2, IL-4 y TNF- α pueden inducir algunos aspectos de la activación (Adams and Hamilton, 1987; Celada and Nathan, 1994).

La activación de los macrófagos se divide en dos grandes grupos (Gordon, 2003):

- **Activación Clásica (M1):** que es la inducida por moléculas bacterianas como el LPS y/o citoquinas pro-inflamatorias como el IFN- γ o el TNF- α . Los macrófagos clásicos aumentan la expresión en membrana de moléculas coestimuladoras y de presentación antigénica, CD40, CD86 y MHC-II, favoreciendo así su capacidad presentadora. Además, son capaces de producir óxido nítrico (NO) a partir de la L-arginina (Gordon, 2003), y secretar citoquinas pro-inflamatorias como IFN- γ , TNF- α , IL-12, IL-1 β ... (Fultz *et al.*, 1993; Di Marzio *et al.*, 1994; Puddu *et al.*, 1997; Munder *et al.*, 1998; Le Page *et al.*, 2000; Frucht *et al.*, 2001; Schindler *et al.*, 2001; Murata *et al.*, 2002) (Figura 9).
- **Activación alternativa (M2):** que es la inducida por citoquinas tipo Th2, como IL-4 o IL-13. Estos macrófagos aumentan en membrana los mismos niveles de moléculas coestimuladoras (CD40, CD80, CD86) que los M1. Sin

embargo, no son capaces de producir NO a partir de la L-arginina ni de controlar el desarrollo de patógenos intracelulares. En su lugar producen Arginasa-1 que metaboliza la L-arginina en L-ornitina, y esta se metaboliza a prolina, para la producción de colágeno, o entra en la ruta de las poliaminas para la proliferación celular (Gordon, 2003). Aumentan su capacidad fagocítica a través del receptor de manosa, del receptor antagonista de IL-1 (IL-1Ra) y de varios SR, que favorece en conjunto la capacidad del macrófago de remodelar y reparar el tejido (Figura 9).

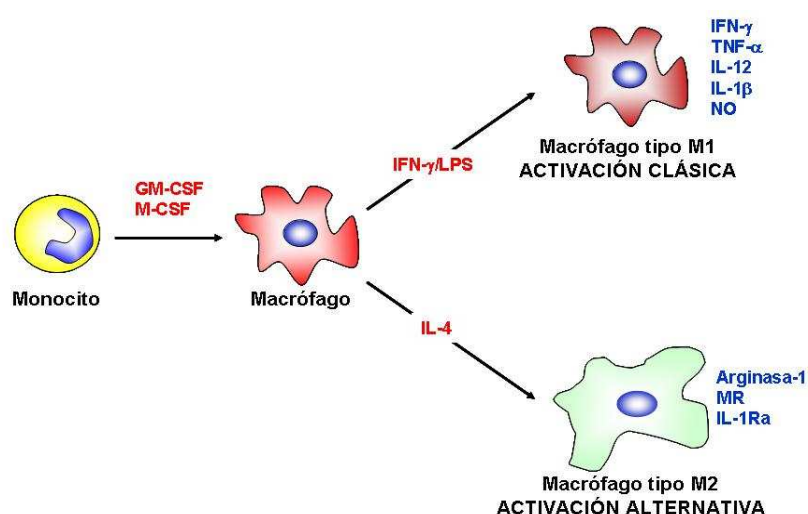


Figura 9. Activación de los macrófagos.

Por otro lado, existen diversos mecanismos de inhibición de la activación clásica de los macrófagos, debido al carácter potencialmente dañino de los mediadores liberados tras la activación de estas células. En general, los agentes que promueven la elevación de los niveles intracelulares de adenosina monofosfato cíclico (AMPc) son potentes inhibidores de la activación de los macrófagos. Como por ejemplo, la prostaglandina E2 (PGE2) (Jackowski *et al.*, 1990) y la adenosina que inhibe a iNOS y la expresión de TNF- α e IL-1 β (Vairo *et al.*, 1990; Cheung and Hamilton, 1992). Además, citoquinas anti-inflamatorias como la IL-10 (O'Farrell *et al.*, 1998; Dagvadorj *et al.*, 2008) y el TGF- β (Imai *et al.*, 2000; Werner *et al.*, 2000; Comalada *et al.*, 2003), también son capaces de inhibir la activación de los macrófagos.

3.4. INFLAMACIÓN MACRÓFAGOS E HIPOXIA

La inflamación y la hipoxia, como se indica en numerosos estudios, están relacionadas, ya que la presencia de áreas hipóxicas es una característica común en tejidos inflamados y dañados (Murdoch *et al.*, 2005). Los macrófagos se acumulan en estas áreas hipóxicas (Lewis and Murdoch, 2005), sin embargo su respuesta a las bajas tensiones de oxígeno no está bien caracterizada.

En los procesos inflamatorios provocados por heridas, los macrófagos presentan la proteína HIF-1 α estabilizada (Albina *et al.*, 2001). Curiosamente, durante la resolución de la inflamación y la cicatrización, se inducen citoquinas reguladoras, como la IL-4, que favorecen a los macrófagos a derivar hacia un fenotipo reparador (Mosser and Edwards, 2008), cuya principal función es la secreción de componentes de la matriz extracelular (Mace *et al.*, 2007).

Los macrófagos activados por la vía clásica expresan altos niveles de HIF, lo que media la capacidad bactericida y la síntesis de NO (Burke *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2003a; Peyssonnaud *et al.*, 2005). Experimentos realizados con ratones transgénicos condicionales de HIF-1 α en la línea mieloide, utilizando varios modelos inflamatorios, demuestran que en ausencia de HIF-1 α disminuye la infiltración y activación de las células mieloides (Cramer *et al.*, 2003).

En condiciones de normoxia se ha descrito que el LPS induce HIF-1 α (Blouin *et al.*, 2004; Frede *et al.*, 2006; Nishi *et al.*, 2008). Por otro lado, HIF-1 α se puede inducir por agentes patógenos como: a) las infecciones por el *Toxoplasma gondii* que reducen la disponibilidad de oxígeno e inducen HIF-1 α para su crecimiento y supervivencia en las células huésped (Spear *et al.*, 2006); b) *Chlamydia pneumoniae* que modula la expresión de HIF-1 α en las células huésped, lo que favorece la captación de glucosa, que es necesaria para que la bacteria se replique de manera rápida y eficiente (Rupp *et al.*, 2007); y c) las infecciones por virus como el virus del papiloma humano (HPV), el virus Epstein-Barr, o el virus de la hepatitis C, también favorecen la actividad de HIF-1 α en la célula huésped (Zinkernagel *et al.*, 2007).

El propósito de esta tesis ha sido caracterizar la respuesta de los macrófagos a la bajada de las tensiones de oxígeno, pero en ausencia de otros estímulos y como ésta

afecta a sus funciones de fagocitosis, presentación antigénica y secreción de citoquinas.

OBJETIVOS

En base a los estudios previos, indicados en la introducción, nos propusimos como objetivos de nuestro trabajo:

1. Caracterización de la respuesta de los macrófagos a hipoxia.

- Análisis de la ruta canónica de HIF, expresión de subunidades de HIF- α y de genes de respuesta a hipoxia.
- Determinación de la capacidad fagocítica en respuesta a hipoxia. Estudio de la unión e internalización de las partículas opsonizadas. Estudio de la expresión de los receptores fagocíticos Fc γ R y CR.
- Análisis de la capacidad presentadora de antígeno en respuesta a hipoxia. Estudio de la expresión de las moléculas de activación y presentación antigénica. Estudio de la respuesta de activación de las células T.
- Análisis de la secreción de citoquinas por los macrófagos en respuesta a hipoxia.

2. Mecanismo de activación de los macrófagos por hipoxia. Búsqueda de los elementos de respuesta a hipoxia (HRE) funcionales en la región cromosómica del IFN- γ , para su posterior caracterización bioquímica y funcional.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ratones

Todos los experimentos han sido realizados con ratones de 6 a 12 semanas de edad, provenientes del Animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid. Las células T, fueron aisladas de ratones transgénicos OT-1 (Hogquist *et al.*, 1994) estos ratones son Rag⁻ y expresan un único TCR que reconoce específicamente el péptido de ovoalbúmina que va desde el aminoácido 257 al 264 (pOVA₂₅₇₋₂₆₄). Los macrófagos fueron aislados de ratones C57BL/6 (H-2b), que presentan un MHC-I compatible con el TCR de los ratones transgénicos OT-1. Los ratones con HIF-1 α silenciado en la línea mieloide (HIF-1 α flox LysMCre) (Cramer *et al.*, 2003; Peyssonnaud *et al.*, 2005) se obtuvieron mediante el cruce de los ratones transgénicos de Cre precedido del promotor específico de tejido mieloide Lisozima M (wt-LysMCre) (Clausen *et al.*, 1999), y de los ratones en los que el exón 2 del gen de HIF-1 α está flanqueado por secuencias *loxP* (HIF-1 α^{loxP}) (Schipani *et al.*, 2001).

Extracción de DNA y genotipaje de los ratones transgénicos

Los ratones wt-LysMCre, HIF-1 α^{loxP} , y HIF-1 α flox LysMCre se genotiparon a partir de una biopsia de la cola. La cola del ratón se incubó, toda la noche a 56°C, con 200 μ l de tampón de lisis (100mM Tris/HCl pH8, 5mM EDTA, 0,2% SDS, 200mM NaCl) y proteinasa K a una concentración final de 100 μ g/ml. Posteriormente se agita y se centrifuga a máxima velocidad para eliminar los restos celulares. Al sobrenadante obtenido (aproximadamente 150 μ l) le añadimos 200 μ l de isopropanol, y lo incubamos durante 15 minutos a -20°C para precipitar el DNA. A continuación se centrifuga durante 15 minutos, se desecha el sobrenadante y se deja secar el DNA precipitado. El DNA se resuspende en 50 μ l de tampón TE (10mM Tris/HCl pH8, 1mM EDTA). Por último, se incuba 15 minutos a 55°C, y se agita para facilitar la disolución del DNA, y se guarda a 4°C. El DNA genómico de las colas se genotiparon, mediante PCR, utilizando los oligonucleótidos de la tabla I

Diana	Dirección	Secuencia
Exón 2	F	TGATGTGGGTGCTGGTGTC
HIF-1 α	R	CCCACATCAGGTGGCTCATAA
CRE	F	CCCAGAAATGCCAGATTACG
Lys	R	CTTGGGCTGCCAGAATTCTC
wtLys	F	TTACAGTCGGCCAGGCTGAC

Tabla I: Secuencias de oligonucleótidos utilizados en el genotipaje de los ratones HIF-1 α flox LysMCre

Cultivo celular

Los macrófagos peritoneales se obtuvieron mediante la inyección intraperitoneal de 2ml de tioglicolato (Sigma, St, Louis, MO) al 4%, que es un estímulo irritante que induce la migración de los macrófagos. Pasados 4-5 días el exudado peritoneal se recogió mediante lavado de la cavidad peritoneal. Los macrófagos se purificaron mediante selección negativa usando bolas magnéticas Gr1+ (Miltenyi Biotech, Gladbach, Germany), y por adhesión a la placa de cultivo y posterior lavado. Las células T CD8+ se asilaron de los ganglios mesentéricos y del bazo de los ratones transgénicos OT-I, se purificaron de otras poblaciones mediante selección negativa usando bolas magnéticas y el purificador magnético AutoMACS (Miltenyi). Ambos tipos celulares se cultivaron en medio RPMI 1640 con GLUTAMAX (Invitrogen). Las líneas celulares RAW264.7 y J774A.1 se crecieron en DMEM (Cambrex). Ambos medios se suplementaron con 100U/ml de penicilina, 100µg/ml de estreptomicina y en presencia de suero de ternera fetal (FCS) (Cambrex) al 2 o al 10%. Cuando el experimento lo requería las células se cultivaron en presencia de 10ng/ml de LPS (Sigma-Aldrich) proveniente de la cepa 026:B6 de *Escherichia coli* o en presencia del análogo del 2-oxoglutarato, dimetiloxalilglicina (DMOG) (Biomol international, LP).

Condiciones de hipoxia

Las células se crecieron en condiciones de normoxia al 21% de oxígeno y al 5% de CO₂ a 37°C ó en condiciones de hipoxia en una estación de trabajo para hipoxia (*in vivo* 400 hypoxia workstation (Ruskin Technology, West Yorkshire, U.K)) que insufla una mezcla de gases en proporción 1% O₂, 5% CO₂ y 94% N₂ (S.E. Carburos Metálicos, S.A., Madrid, Spain) en el interior de la cámara estanca. Para los experimentos *in vivo*, los ratones se mantuvieron al 21% O₂ (N), o se expusieron al 13% O₂ durante una hora (periodo de acondicionamiento) y posteriormente se bajó la tensión de oxígeno hasta alcanzar el 7,5% O₂ (Hx) que se mantuvo durante el resto del experimento. Los macrófagos peritoneales aislados en hipoxia se seleccionaron por adhesión a la placa de cultivo.

Inmunoprecipitación y western blot

Las células se lisaron en Laemmli y se resolvieron mediante electroforesis usando geles de poliacrilamida-SDS al 10%. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Biorad, CA), que se bloqueó con TBS-T (NaCl, KCl, 50mM Tris pH 7,5, 0,1% Tween-20) con 5% leche durante una hora y se incubó durante toda la noche y a 4°C con el monoclonal anti-HIF-1α (1/1000; R&D Systems), y los policlonales anti-

PHD3 (1/2000; Bethyl Laboratories) o anti-Glut-1 (1/1000; Santa Cruz Biotechnology), y como control de carga se usó el monoclonal anti-Tubulina (1/1000, Sigma). Para los ensayos de presentación antigénica, los conjugados (macrófago-célula T) se procesaron para inmunoprecipitación o western blot. Las células se lisaron durante 40 minutos a 4°C en un tampón de lisis compuesto por 50mM Tris-HCl pH 7,5 con un 1% NP-40, 0,2% Tritón X-100, 150mM NaCl e inhibidores de fosfatasa (PhosStop, Roche Diagnostics. Mannheim, Germany) y proteasas (Complete, Roche Diagnostics), posteriormente los lisados se centrifugaron para limpiarlos de núcleos y restos celulares. Para los análisis de CD3, los sobrenadantes se pre-clarearon, durante la noche a 4°C, con proteína A-Sefarosa y se inmunoprecipitó con anti-CD3 ζ (1/100) de conejo (Sahuquillo *et al.*, 1998) y proteína A-Sefarosa. Los inmunoprecipitados se lavaron con el tampón de lisis y se resolvieron por *western blot* con el anticuerpo monoclonal 4G10 (1 μ g/ml, Upstate Biotechnology. Lake Placid, NY, USA) que reconoce fosfotirosinas y como control de proteína total se usó anti-CD3 ζ . Para el análisis de LAT, los lisados se resolvieron mediante *western blot* y se incubaron con el anticuerpo policlonal anti-fosfo-LAT-195 (1 μ g/ml, Upstate Biotechnology.) y con el monoclonal anti-LAT (2 μ g/ml, Upstate Biotechnology) como control de proteína total. La unión del anticuerpo fue detectada por quimioluminiscencia potenciada: ECL (Amersham Pharmacia Biotec. Piscataway, New Jersey, USA) y visualizada con un analizador digital de imagen (FUJIFILM LAS-1000 CH).

Determinación de los niveles de RNA mensajero por PCR cuantitativa en tiempo real

El RNA mensajero se extrajo de las células tratadas en las diferentes condiciones con Ultraspec (Biotecx; Houston, Tx, USA) siguiendo las especificaciones del fabricante. El RNA extraído se cuantificó usando el Nanodrop (ThermoFisher Scientific; Waltham, MA, USA) y se testó su integridad mediante electroforesis en geles de agarosa. A continuación se retrotranscribió, 1 μ g de cada muestra, a cDNA (Improm-II reverse transcriptase; Promega) y se usó como molde para la amplificación por PCR, con el kit "LC Fast Start DNA master SYBR Green I" y el sistema Light Cycler (Roche Applied Science). Los datos fueron analizados con Light Cycler software versión 3.5.28 (Idaho technology). Cada muestra se realizó por duplicado y se normalizó por el RNA mitocondrial 28S (Los oligonucleótidos usados se encuentran indicados en la Tabla II).

Diana	Dirección	Secuencia
28S	F	CAGTACGAATACAGACCG
	R	GGCAACAACACATCATCAG
HIF-1 α	F	GTTTACTAAAGGACAAGTCACC
	R	TTCTGTTTGTGAAGGGAG
PHD-3	F	GATGCTGAAGAAAGGGC
	R	CTGGCAAAGAGAGTATCTG
VEGF	F	TGCCAAGTGGTCCCAG
	R	TGCCAAGTGGTCCCAG
BNIP-3	F	GGCGTCTGACAACTTCC
	R	ACCGCATTTACAGAACAAATTAAC
IFN- γ	F	TGGCTCTGCAGGATTTTCATG
	R	TCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA
IL12-p40	F	CAGATGACATGGTGAAGACG
	R	GTTGTGGAAGAAGTCTCTCTAGTA
IL18	F	AATGGCTGCCATGTCA
	R	TCCGTATTACTGCGGTTG
IL10	F	CCAAGCCTTATCGGAAATG
	R	TGGCCTTGTAGACACC

Tabla II: Secuencias de oligonucleótidos. Pares de oligonucleótidos usados para la amplificación por PCR a tiempo real.

Análisis de los marcadores de activación y citoquinas

En los macrófagos, la síntesis de citoquinas se detectó por PCR cuantitativa (oligonucleótidos usados en Tabla II), mientras que la secreción de IL-12 e IFN- γ , se detectó mediante ensayos de ELISA (BD Biosciences). La expresión de las distintas moléculas en la superficie de los macrófagos se analizó mediante citometría de flujo (FAQScalibur BD Bioscience) después de 40h de cultivo, incubándolas con anti - CD11b, -CD32/16, -CD69, -MHC-I (H-2b), -MHC-II (I-A, I-B) marcados con FITC y con anti -CD18, -CD40, -CD86, y -F4/80 biotinilados. Todos los anticuerpos son de BD Pharmingen, excepto F4/80 que se adquirió de Caltag Laboratories.

Ensayos de fagocitosis

Los eritrocitos de carnero (SRBC) (Oxoid. Cambridge, UK) fueron opsonizaros para ser fagocitados vía Fc γ R ó CR (Olazabal *et al.*, 2002). Para Fc γ R los SRBC se incubaron con anti-SBRC IgG de conejo (MP Biomedicals. Illkirch, France) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Para CR los SRBC se incubaron con IgM (Accurate Chemical. WESTBURY, NY, USA) y con suero deficiente en C5 (Sigma-Aldrich. Saint Luis, Missouri, USA). Los macrófagos se cultivaron en normoxia

e hipoxia durante 40h y se les quitó el FBS, 2 horas antes de añadirles los SRBC opsonizados (en un ratio 1:20). Pasados 15 minutos de la fagocitosis las células fueron fijadas y teñidas con anticuerpos anti-conejo marcados con Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Nasdaq, IVNG) para detectar los SRBCs, y con faloidina marcada con Alexa Fluor 564 (Molecular Probes) para detectar F-actina. En la inmunofluorescencia, después de la fijación, los eritrocitos internalizados aparecen grandes e hinchados mientras que los externos aparecen pequeños y encogidos.

Ensayos de presentación antigénica

Los macrófagos se cultivaron en normoxia o en hipoxia durante 40 horas y posteriormente se les añadió el péptido OVA (257-264, SIINFEKL) a las dosis indicadas, pasadas 2 horas se pusieron en contacto, durante 20 minutos, con los linfocitos T péptido específicos y se realizaron ensayos de inmunoprecipitación (ver sección Inmunoprecipitación y western blot) e inmunofluorescencia. El marcaje para inmunofluorescencia se realizó usando el anticuerpo monoclonal APA 1/1 que reconoce la conformación activa de CD3 ϵ (Risueno *et al.*, 2005; Risueno *et al.*, 2006) y el monoclonal anti- α -tubulina-FITC (Sigma-Aldrich) para reconocer el centro organizador de microtúbulos (MTOC).

Marcaje intracelular de citoquinas en células T y proliferación

El marcaje intracelular de IL-2 e IFN- γ en las células T se realizó activándolas con PMA e ionomicina e inhibiendo la secreción de citoquinas con brefeldina A (REF 41). Los ensayos de proliferación celular se realizaron durante 72h en normoxia o en hipoxia, con células T marcadas con 5 μ l [5(6)]-ester succinimidil diacetato de carboxifluoresceína (CFSE) (Molecular Probes, Nasdaq, IVGN, USA) y a distintas concentraciones de pOVA (0.1pM-100nM). Posteriormente se recuperaron las células y se analizaron mediante citometría de flujo, los niveles de CFSE en membrana en las células CD8+. El marcaje de Foxp3/CD25/CD8 se realizó usando un kit de detección de células T reguladoras (eBioscience, Inc, San Diego, CA, USA).

Ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)

La línea celular RAW264.7 y los macrófagos peritoneales fueron cultivados en placas de 10cm hasta una confluencia de 85%, en cuyo momento se sometieron a hipoxia (1% O₂) o se dejaron en condiciones de normoxia (21%) durante 6h. Posteriormente, las células fijadas con 1% (v/v) de formaldehído (concentración final) durante 12 minutos a 37°C, fueron lavadas con PBS frío y después lisadas en 1ml de

tampón de lisis (1% SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris/HCl, pH 8.1, y el inhibidor de proteasas Complete (Roche Diagnostics)). Los lisados celulares se incubaron en hielo durante 10 minutos y después se sonicaron bajo las condiciones establecidas para cortar el DNA en fragmentos que se encuentren entre 200 y 1500 pb. Seguidamente se retiró el material insoluble por centrifugación y fueron recogidos y guardados 30µl de cada muestra (input), el resto se diluyó en tampón de inmunoprecipitación (1% Tritón X-100, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl y 20 mM Tris/HCl, pH 8.1). Los lisados fueron preclareados con suero preimmune y 200µg de DNA de esperma de salmón/Proteína A agarosa (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, U.S.A.) durante 1h a 4°C. Las muestras se inmunoprecipitaron dos veces, inicialmente con suero de conejo durante 6h (IgG control) y después durante la noche a 4°C con el anticuerpo policlonal anti-HIF-1α (Abcam, ab2185. Cambridge, UK). Los inmunocomplejos se recuperaron por la adición 400µg Proteína A agarosa a las muestras y posteriormente se lavaron repetidamente durante 15 minutos en TSE I (0.1% SDS, 1% Tritón X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris/HCl, pH 8.1 y 150 mM NaCl), TSE II (0.1% SDS, 1% Tritón X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris/HCl, pH 8.1 y 500 mM NaCl) y tampón III (0.25 M LiCl, 1% Nonidet P40, 1% deoxicolato, 1 mM EDTA y 10 mM Tris/HCl, pH 8.1). Finalmente, los complejos, se lavaron dos veces con tampón TE (10 mM Tris, pH 8.0, y 1 mM EDTA) y extraído dos veces con un tampón que contiene 1% SDS y 0.1 M NaHCO₃. Las proteínas fueron extraídas por adición de proteinasa K (30 µg/muestra) durante 2h a 42°C, y el DNA fue purificado usando un kit de extracción PCR de Qiagen, eluyendo en 50 µl de agua. El DNA inmunoprecipitado fue amplificado por PCR usando los oligonucleótidos indicados (ver Tabla III).

Diana	Dirección	Secuencia
IFN-γ ChIP	F	CTCATCGTCAGAGAGCCCAA
	R	AGGATCAGCTGATGTGTCTT
IFN-γ promotor	F	ctcgagCCTTGGGTGTGTTGAGTGAA
	R	aagcttAGGAGAAGCCCAGAACTTCT
IFN-γ mutado	F	CTTGTGAAAATTAGCAATCCCGAGGA
	R	TCCTCGGGATTGCTAATTTTCACAAG

Tabla III: La región genómica del promotor de IFN-γ de ratón se amplificó para los ensayos de inmunoprecipitación de cromatina con los oligonucleótidos marcados como IFN-γ ChIP. Los oligonucleótidos marcados como IFN-γ promotor se emplearon para la amplificación del fragmento genómico del promotor de IFN-γ, mientras que los marcados como IFN-γ mutado, se usaron para introducir las mutaciones en la secuencia de su HRE.

Generación de las construcciones de plásmidos

Para clonar la región promotora de IFN- γ , la secuencia genómica de ratón que va desde -848 a -22 en relación con el sitio de inicio de la transcripción fue amplificada por PCR usando los oligonucleótidos indicados (ver Tabla III). Esta secuencia contiene el elemento regulador inducible por hipoxia putativo localizado. El producto de PCR fue clonado en el plásmido pCR 2.1-TOPO TA (Invitrogen, Leek, The Netherlands) y posteriormente subclonado en los sitios XhoI y HindIII del plásmido pGL3 basic (Promega, Mannheim, Germany), que contiene el gen testigo de la luciferasa de luciérnaga, generando pIFN γ -Luc. La forma mutada del HRE para pIFN γ -Luc se generó por PCR con los oligonucleótidos indicados (ver Tabla III). El DNA genómico usado como temple en la PCR fue obtenido de la línea celular J774A.1.

Nucleofección de las células y ensayos de luciferasa

La línea celular RAW264.7 se nucleofectó usando los protocolos de nucleofección de Amaxa. Cada punto se nucleofectó usando una mezcla de DNA que contenía 1 μ g del plásmido reportero correspondiente (pGL3-PHD3-Luc (Pescador *et al.*, 2005), pGL3-IFN γ -Luc y/o sus construcciones mutadas en el HRE pGL3-PHD3Mut-Luc y pGL3-IFN γ Mut-Luc) y con 0,5 μ g de un plásmido que codifica para la proteína fluorescente luciferasa renila. Pasadas 4-6 horas las células fueron sometidas a condiciones de normoxia (21% O₂) o hipoxia (1%) durante un tiempo adicional de 16 horas. Posteriormente, las células fueron lisadas y se determinó la actividad luciferasa mediante un sistema dual de luciferasa (Promega, Mannheim, Germany) en el cual, la fluorescencia de la actividad luciferasa fue normalizada con respecto a la actividad luciferasa Renila. Cada condición experimental fue medida por duplicado.

Transfección de RNA de Interferencia (siRNA)

La línea celular RAW264.7 se creció hasta una confluencia del 70% en placas de 3,5cm y se transfectaron usando Lipofectamina 2000 (Invitrogen, USA) con 50pmol de siRNA. HIF-1 α siRNA (sc-44225) y el siRNA control (sc-37007). Posteriormente, las células transfectadas se incubaron durante 24 horas a 37°C y 5% CO₂ en condiciones de normoxia o hipoxia. Los macrófagos peritoneales se cultivaron al 70% en placas de 3,5cm y se transfectaron usando HiPerFect (Qiagen) con 5nM de siRNA (scrambled, HIF-1 α , o IFN- γ). Posteriormente, las células transfectadas se incubaron durante 24-40 horas a 37°C y 5% CO₂ en condiciones de normoxia o hipoxia. Todos los siRNA fueron adquiridos de Santa Cruz Biotechnology.

Análisis estadístico:

Los datos experimentales se analizaron con Prism™ GraphPad (versión 4.00) software, utilizando el método estadístico adecuado. El P valor obtenido se indica en el texto.

RESULTADOS

1. CARACTERIZACIÓN DE LOS MACRÓFAGOS CULTIVADOS A BAJAS TENSIONES DE OXÍGENO

1.1. CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA DE LOS MACRÓFAGOS A HIPOXIA

La mayoría de los tipos celulares responden a hipoxia estabilizando HIF e induciendo sus genes dependientes, sin embargo esta respuesta celular no estaba caracterizada en nuestro modelo celular de macrófagos elicitados provenientes del peritoneo de ratón.

En primer lugar analizamos qué subunidad de HIF- α se expresaba en los macrófagos peritoneales, ya que aunque tanto HIF-1 α como HIF-2 α pueden co-expresarse en el mismo tejido, se han descrito respuestas que existen respuestas diferenciales de genes dependiendo de qué subunidad de HIF sea la mayoritaria (Talks *et al.*, 2000; Wiesener *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2005). Observamos, que aunque ambas se amplificaban a nivel de RNA mensajero (datos no mostrados), a nivel de proteína, la subunidad HIF-2 α era indetectable, mientras que la subunidad HIF-1 α , se regulaba claramente por hipoxia e incluso por LPS (control de activación) (Figura 10) como habían descrito anteriormente Blouin y col (Blouin *et al.*, 2004).

A continuación, estudiamos si esta subunidad HIF-1 α era funcional. Para ello analizamos tanto proteínas como genes cuya expresión fuese dependiente de HIF comparando macrófagos peritoneales cultivados en normoxia (21% O₂), tratados o no con LPS, con macrófagos cultivados en hipoxia (1% O₂). Realizamos ensayos de *western blot* para analizar tanto PHD-3 como Glut-1 (Figura 10A) y RT-PCRs, para analizar PHD-3 y VEGF-1 (Figura 10B) y observamos que los macrófagos cultivados en hipoxia aumentaban tanto el RNA mensajero como las proteínas dependientes de HIF analizadas. Además, observamos que el HIF-1 α acumulado en normoxia con el tratamiento de LPS, también era capaz de inducir parcialmente tanto el RNA mensajero como las proteínas analizadas (Blouin *et al.*, 2004; Frede *et al.*, 2006).

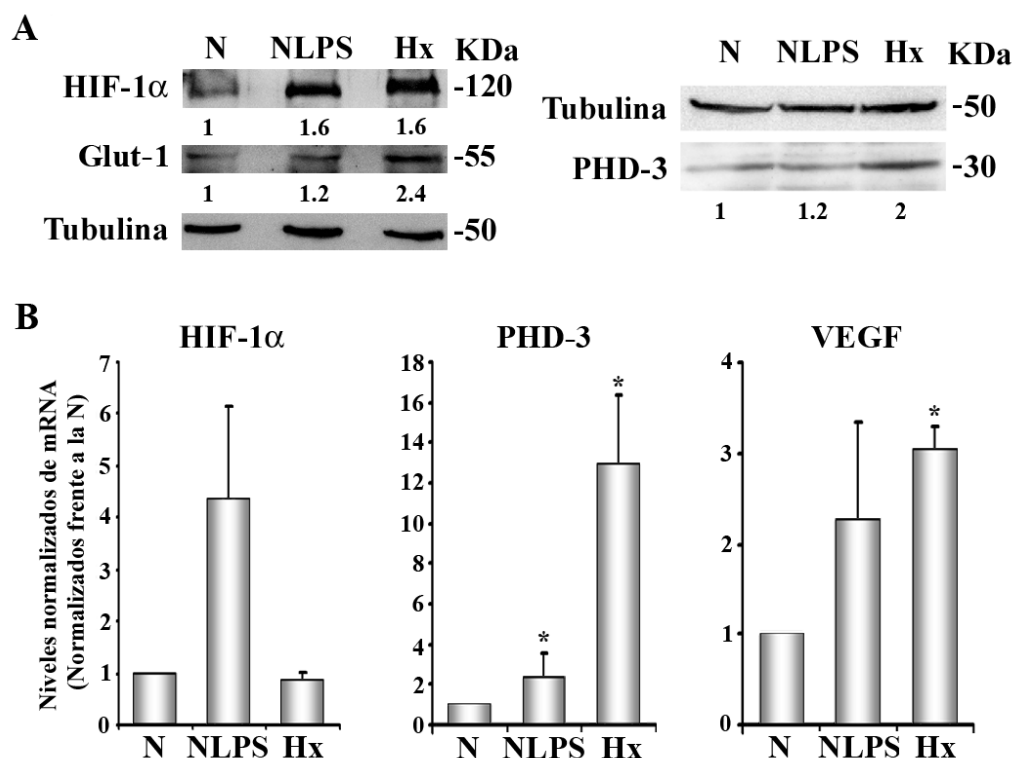


Figura 10. Respuesta a hipoxia de los macrófagos elicitados. **A**, Análisis por western blot de la expresión de HIF-1 α , Glut-1, PHD-3, y tubulina, en macrófagos elicitados cultivados durante 16h en normoxia (N), en normoxia tratados con 10ng/ml de LPS (NLPS), o en hipoxia (Hx). El resultado del análisis densitométrico, que se muestra debajo de los paneles, representa las inducciones con respecto a la normoxia, normalizadas frente a la tubulina. **B**, Media aritmética, de cuatro experimentos, de los niveles de mRNA de HIF-1 α , PHD-3, y VEGF, en macrófagos tratados en las mismas condiciones que en **A** (*, $p < 0,05$).

Estos datos nos indicaron que los macrófagos elicitados del peritoneo de ratón expresan HIF-1 α y son capaces de responder a hipoxia. Además, estos datos fueron corroborados en las líneas celulares de macrófagos de ratón J774A.1 y RAW264.7 (datos no mostrados).

1.2. LA ACTIVIDAD FAGOCÍTICA DE LOS MACRÓFAGOS SE POTENCIA EN HIPOXIA

Teniendo en cuenta que otros grupos han relacionado la hipoxia con la fagocitosis (Lewis *et al.*, 1999), quisimos determinar la capacidad fagocítica, en nuestro modelo de macrófagos elicitados cultivados a bajas tensiones de oxígeno, analizando dos rutas diferentes y muy conocidas de fagocitosis, como son la fagocitosis mediada por

los receptores de complemento (CR ($\alpha_M\beta_2$)) y la mediada por los receptores de las regiones Fc de las inmunoglobulinas (Fc γ R (CD32/CD16)). En ambos casos analizamos tanto la unión como la internalización de glóbulos rojos de carnero (SRBC) opsonizados de manera específica para cada una de ellas (Ver materiales y métodos).

Observamos que, para ambos receptores, los macrófagos elicitados cultivados en hipoxia (Hx) en comparación con los cultivados en normoxia (N) fueron más eficientes en el proceso fagocítico, tanto a nivel de unión como a nivel de internalización de los SRBC opsonizados (Figura 11A) (2,5-3 veces de inducción para CR y 1,5 veces de inducción para Fc γ R; Figura 11B-C), al igual que en el control de los macrófagos elicitados tratados con LPS y cultivados en condiciones de normoxia (NLPS).

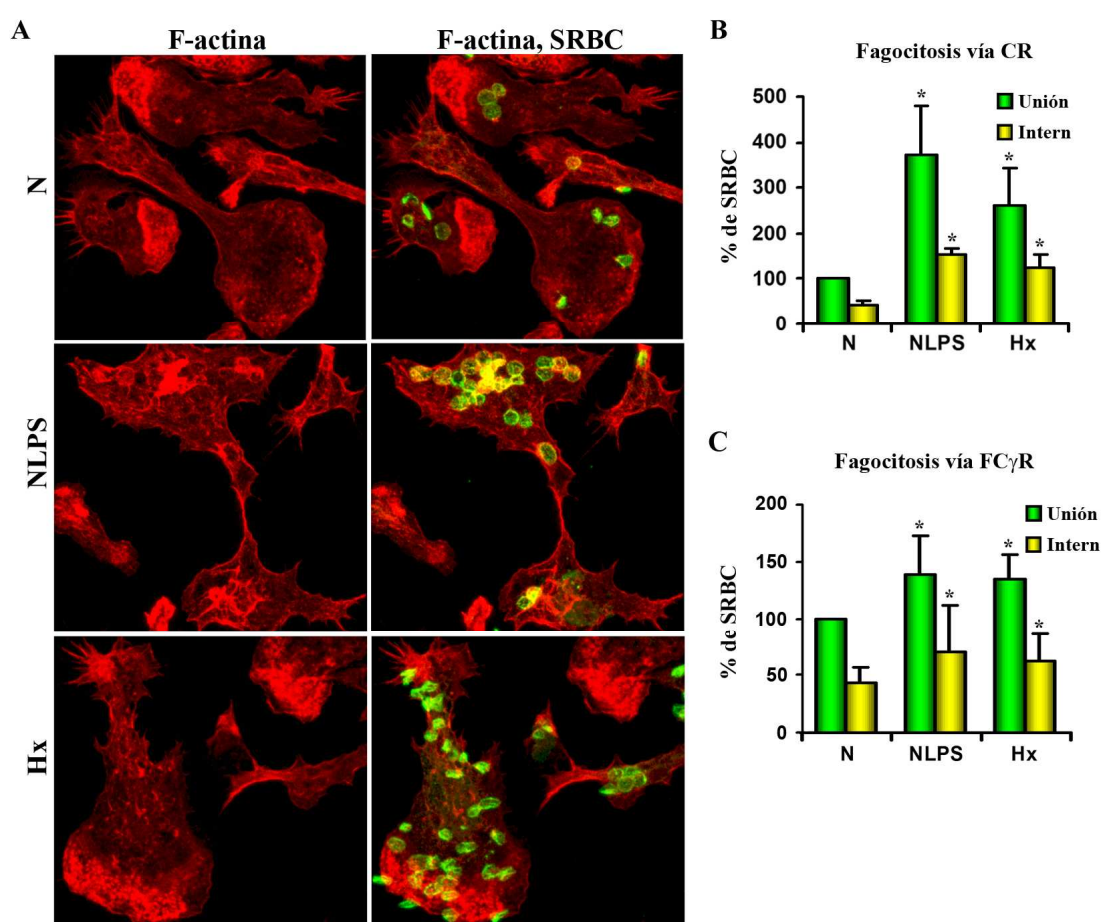


Figura 11 La hipoxia favorece la fagocitosis vía CR y Fc γ R. Los ensayos de fagocitosis fueron realizados con macrófagos peritoneales cultivados en hipoxia (Hx) y en normoxia con (NLPS) o sin LPS (N) durante 40h. **A**, las células se fijaron y se tiñeron para detectar la F-actina (Rojo, *paneles izquierdos*) y los SRBC (verde). Cuantificación de la unión e internalización de SRBCs, **B**, vía CR y **C**, vía Fc γ R. Los datos muestran las medias, del porcentaje de unión o internalización, normalizadas frente a la normoxia, y provienen de seis experimentos independientes (*, $p < 0,05$).

Como los macrófagos cultivados a bajas tensiones de oxígeno eran capaces de aumentar la unión de partículas, y por lo tanto su internalización, analizamos los niveles en membrana de los receptores implicados en estas fagocitosis, además, se había descrito por otros autores, que CD11b aumentaba su expresión en membrana en neutrófilos cultivados en hipoxia (Scannell *et al.*, 1995a; Scannell *et al.*, 1995b; Lan *et al.*, 2004). Analizamos mediante citometría de flujo, tanto CD11b (α_M) como CD18 (β_2) que forman el receptor de complemento (CR), además de CD32/CD16 (Fc γ R). Tanto CR, como Fc γ R se inducían tras el tratamiento de hipoxia, de una manera similar a la inducción por LPS (Figura 12).

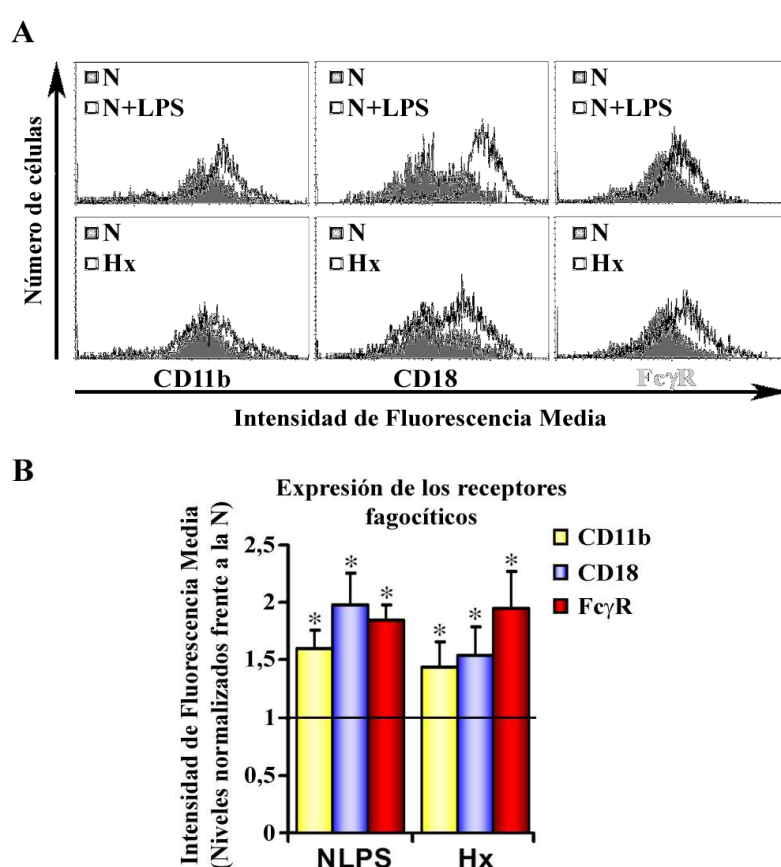


Figura 12. La expresión en membrana de CD11b, CD18 y Fc γ R se induce en macrófagos cultivados a bajas tensiones de oxígeno. Los macrófagos peritoneales se cultivaron en hipoxia (Hx) y en normoxia con (NLPS) o sin LPS (N) durante 40h, y se analizó, mediante citometría de flujo, **A**, la expresión en membrana de CD11b, CD18, y Fc γ R, de los macrófagos cultivados en normoxia frente a los tratados con LPS (*histogramas superiores*), y los macrófagos cultivados en normoxia frente a los cultivados en hipoxia (*histogramas inferiores*). **B**, Valor medio de la intensidad de fluorescencia media, de cinco experimentos independientes, normalizados frente a la normoxia (*, $p < 0,05$).

Estos resultados se confirmaron en las líneas celulares RAW 264.7 y J774A.1 obteniéndose los mismos patrones de inducción (datos no mostrados).

En conjunto, estos datos indican que la hipoxia promueve la unión e internalización de partículas, debido, al menos parcialmente, al aumento de la expresión de los receptores CR y FcγR en membrana, lo que se traduce en una fagocitosis más eficiente.

1.3. LA HIPOXIA AUMENTA LA EXPRESIÓN DE LAS MOLÉCULAS DE PRESENTACIÓN ANTIGÉNICA EN LOS MACRÓFAGOS Y FAVORECE LA FORMACIÓN DE SINAPSIS INMUNOLÓGICAS

Los macrófagos responden a la falta de oxígeno potenciando su actividad fagocítica, por lo que estudiamos cómo afectaba la hipoxia a otra de las funciones de los macrófagos como es la presentación antigénica.

En primer lugar analizamos si la hipoxia preparaba a los macrófagos para una mejor presentación antigénica, por lo que analizamos mediante citometría de flujo la expresión en membrana de las moléculas co-estimuladoras y de presentación antigénica. Observamos que los niveles de expresión de CD40, CD69, CD80 y MHC-I se incrementaban en la membrana de los macrófagos elicitados cuando el cultivo se realizaba a bajas tensiones de oxígeno (Figura 13A) con respecto a los cultivados en normoxia. Este aumento era similar al observado con los macrófagos que habían sido tratados con LPS. Sin embargo, ni CD80, ni MHC-II se inducían en hipoxia de manera significativa (Figura 13B).

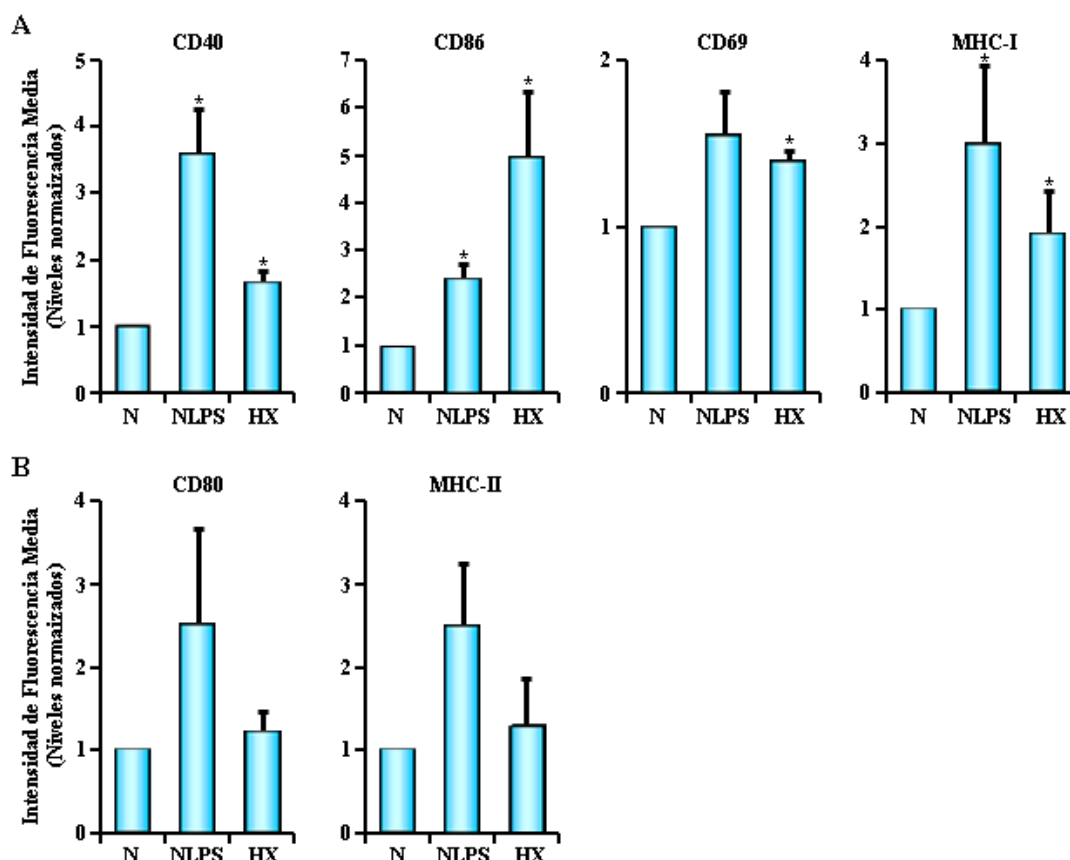


Figura 13. Expresión en membrana de las moléculas co-estimuladoras y de presentación antigénica. Análisis por citometría de flujo de **A**, CD40, CD69, CD86 y MHC-I, **B**, CD80 y MHC-II, de macrófagos cultivados con o sin LPS, o en hipoxia. Los resultados muestran la media de la intensidad de fluorescencia media, de cinco experimentos independientes, normalizada frente a la normoxia (*, $p < 0,05$).

Teniendo en cuenta estos resultados, analizamos y caracterizamos la formación de la sinapsis inmune (SI) de macrófagos cultivados a bajas tensiones de oxígeno con células T. Como la expresión en membrana de MHC-I aumentaba de manera significativa, analizamos la presentación antigénica a través de este complejo con células T CD8⁺.

Una vez cultivados los macrófagos durante 40 horas tanto en normoxia como en hipoxia, y de añadirles el péptido específico de ovoalbúmina OVA₂₅₇₋₂₆₄ (OVA), añadimos las células T CD8⁺ específicas para este péptido, extraídas de ratones OT-I, y determinamos el número de las uniones macrófago-célula T (conjugados) que se formaron. Después de 20 minutos no observamos diferencias en el número de conjugados formados en las diferentes condiciones (datos no mostrados).

Otro de los parámetros que analizamos en los conjugados fue la translocación del centro organizador de microtúbulos (MTOC), ya que para que la célula T se active durante la SI, es necesario que el MTOC, junto con el aparato de Golgi, se reorienten hacia el sitio de contacto (Kupfer *et al.*, 1994) para la secreción de citoquinas y gránulos. Observamos, mediante ensayos de inmunofluorescencia de conjugados teñidos con anti-tubulina, que en todas las condiciones la eficiencia de translocación al sitio de contacto era muy alta (70%), y que ésta aumentaba ligeramente en células T cultivadas en hipoxia o tratadas con LPS (Figura 14A y C).

Ya que el número de conjugados formados no se veía alterado, ni la reorientación del MTOC aumentaba significativamente en condiciones de hipoxia en comparación con normoxia, analizamos la eficiencia de éstas SI formadas a bajas tensiones de oxígeno. Para ello detectamos, mediante inmunofluorescencia con el anticuerpo específico APA 1/1, la conformación activa de la cadena CD3 ϵ (Risueno *et al.*, 2005; Risueno *et al.*, 2006). Este cambio conformacional es indicativo de sinapsis productivas que llevan a la activación de la célula T (Risueno *et al.*, 2005). Observamos que los macrófagos cultivados en hipoxia presentaban la conformación activa del TCR/CD3 ϵ en un porcentaje mucho mayor que los cultivados en normoxia (Figura 14B y C).

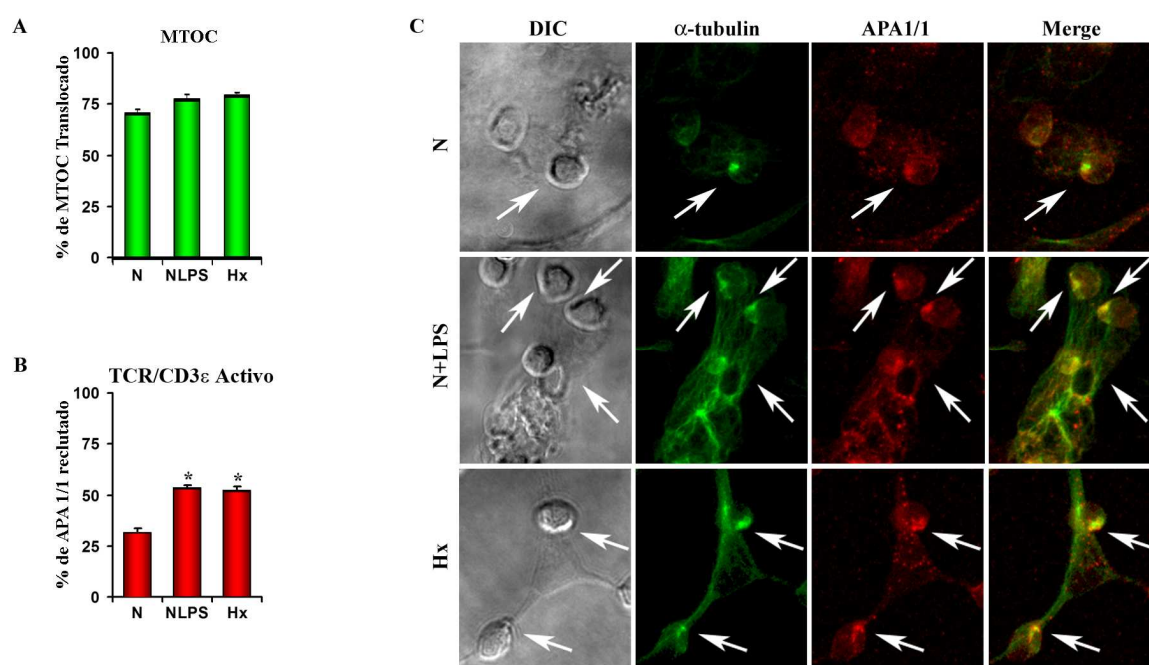


Figura 14. Los macrófagos cultivados a bajas tensiones de oxígeno forman SI de manera más eficientemente que los cultivados en normoxia. Los conjugados formados, durante 20 minutos, entre

los macrófagos en las diferentes condiciones y las células T, se usaron para determinar: **A**, el porcentaje de translocación del MTOC, en las células T. **B**, el porcentaje de células T, con un TCR/CD3 ϵ con conformación activa. Los resultados corresponden a la media aritmética de cuatro experimentos independientes (*, $p < 0,01$). **C**, Tinción de los conjugados macrófago-célula T, en el panel izquierdo se muestra el contraste por interferencia diferencial (DIC) o interferencia de Normarski, el MTOC se tiñó con el anticuerpo anti-tubulina (verde), la conformación activa del TCR/CD3 ϵ se detectó con el anticuerpo APA1/1 (rojo), el solapamiento de las dos imágenes se muestra en el panel derecho (merge).

A continuación, analizamos el efecto de los macrófagos sobre la activación de la célula T mediante diferentes proteínas que se fosforilan tras la señal de activación de TCR, como CD3 ζ y LAT. El análisis de la inmunoprecipitación de CD3 ζ y del *western blot* de LAT, nos mostró que en presencia del péptido OVA, los macrófagos cultivados en hipoxia (Hx+) así como los tratados con LPS (NLPS+) inducían una mayor fosforilación tanto de TCR/CD3 ζ como de LAT (Figura 15), en comparación con los macrófagos cultivados en normoxia (N+). Como control de la hipoxia sobre las células T, se analizaron las células T en ausencia de macrófagos. Además, como control basal de la fosforilación de estas proteínas analizamos macrófagos con células T sin péptido. Ambos controles, inducían basalmente, tanto en normoxia como en hipoxia, la fosforilación de TCR/CD3 ζ y de LAT.

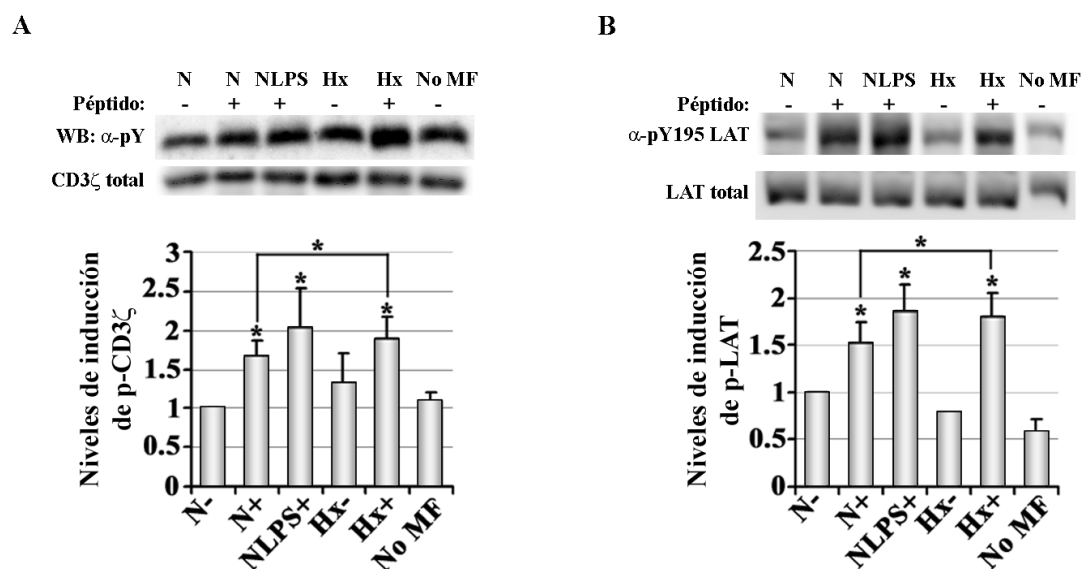


Figura 15. Los macrófagos cultivados en hipoxia (Hx+) inducen una mayor fosforilación de TCR/CD3 ζ y de la Y195 de LAT. Los conjugados macrófagos-células T se procesaron para **A**, inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-CD3 ζ , y se revelaron con los anticuerpos anti-fosfotirosinas 4G10 (*panel superior*), y anti-CD3 ζ total (*panel inferior*). **B**, western blot revelado con los anticuerpos anti-pY195 LAT (*panel superior*), y anti-LAT total (*panel inferior*). Las gráficas muestran la media de los

análisis densitométricos de la fosforilación de CD3 ζ y LAT, normalizados por la proteína total correspondiente, provenientes de cuatro experimentos independientes (*, $p < 0,05$).

Teniendo en cuenta estos resultados, podemos concluir que los macrófagos cultivados en hipoxia aumentan la expresión de CD40, CD69, CD86 y MHC-I en membrana. Así mismo inducen más eficientemente la formación de sinapsis inmunes, además de los eventos tempranos de señalización del TCR en las células T. Por lo que en conjunto, los resultados indican que los macrófagos a bajas tensiones de oxígeno son más eficientes en la presentación antigénica.

1.4. ACTIVACIÓN DE CÉLULAS T

Analizamos los eventos tardíos de activación de la célula T como consecuencia de la formación de conjugados, la secreción de IL-2 e IFN- γ y su posterior expansión clonal.

A las 48h de la formación de conjugados (en ausencia y en presencia del péptido específico OVA) analizamos, por tinción intracelular, el porcentaje de células T que producían IL-2 y/o IFN- γ (Figura 16A). Ambas citoquinas se producían en los conjugados de células T con los macrófagos en normoxia. Esta inducción aumentaba de manera significativa cuando, tanto el cultivo de los macrófagos como el contacto con las células T, se realizaba en hipoxia (Hx) en vez de normoxia (N) (Figura 16A), y era similar a la obtenida con los macrófagos activados por LPS (NLPS). Además, como control del basal, se analizaron las células T en ausencia de macrófagos

Para descartar el posible efecto de la hipoxia sobre las células T, cultivamos los macrófagos en las distintas condiciones tanto en normoxia como en hipoxia durante 40h y los fijamos. Una vez fijados se incubaron con el péptido OVA y se formaron los conjugados con las células T en normoxia. Los resultados fueron similares al experimento anterior (Figura 16B), lo que indica que los macrófagos cultivados en hipoxia que presentan el péptido OVA inducen la producción de citoquinas por parte de la célula T tanto en normoxia como en hipoxia.

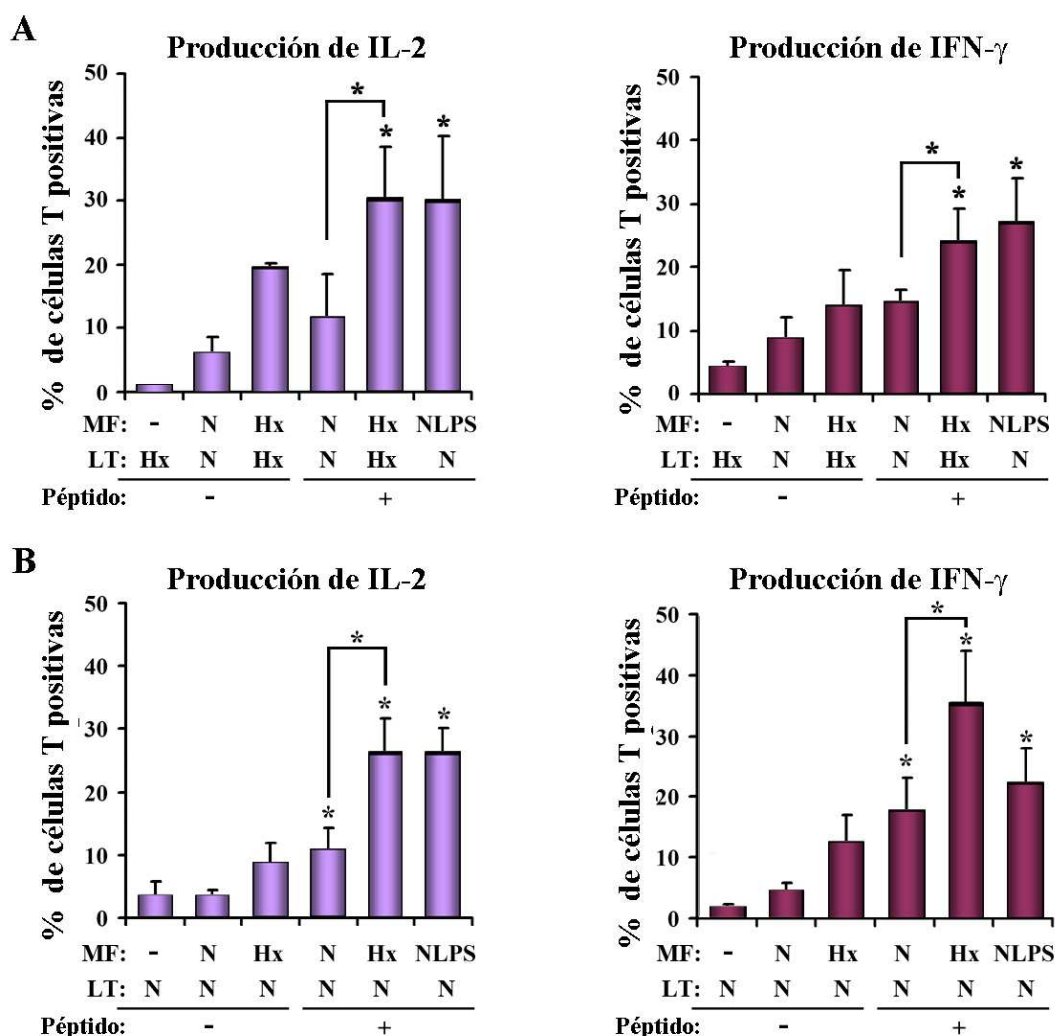


Figura 16. Producción de IL-2 e IFN- γ por células T. Los macrófagos (MF) se cultivaron en normoxia (con o sin LPS) o hipoxia durante 40h y **A**, se formaron los conjugados macrófago-células T (LT) en las mismas condiciones, durante 40h, en presencia o ausencia de 60nM de pOVA. **B**, Se fijaron los macrófagos y se formaron los conjugados macrófago-células T en normoxia, durante 40h, en presencia o ausencia de 60nM de pOVA. En ambos casos se analizó, mediante citometría de flujo, la producción intracelular de IL-2 (*panel izquierdo*) e IFN- γ (*panel derecho*), por las células T. Los datos se han cuantificado y expresado según el porcentaje de células T positivas, de cuatro experimentos independientes (*, $p < 0,05$).

Teniendo en cuenta todos los resultados podemos sugerir que en hipoxia los macrófagos son más eficientes formando sinapsis inmunes productivas, e induciendo la producción de citoquinas inflamatorias por parte de la célula T.

Analizamos en nuestro modelo, si los macrófagos eran capaces de inducir la proliferación de las células T en hipoxia, en comparación con normoxia. Como se había descrito que dependiendo de la dosis de péptido usada se puede inducir la

estimulación o la anergia de las células T (Oved *et al.*, 2007; Olazabal *et al.*, 2008), usamos un amplio rango de concentraciones del péptido específico OVA. Curiosamente, los macrófagos que fueron cultivados en normoxia y tratados con LPS requerían menor rango de concentración de péptido (1-10pM) que los no tratados (N) (10-100pM), para inducir la proliferación de las células T (Figura 17). Sorprendentemente, resultados preliminares nos indicaban que los macrófagos que fueron cultivados en hipoxia no inducían la proliferación de las células T en ninguna de las concentraciones de péptido testadas (de 0,1pM a 10nM) (Figura 17). Esta ausencia de proliferación de las células T en hipoxia, ya había sido descrita por otros grupos (Thiel *et al.*, 2007).

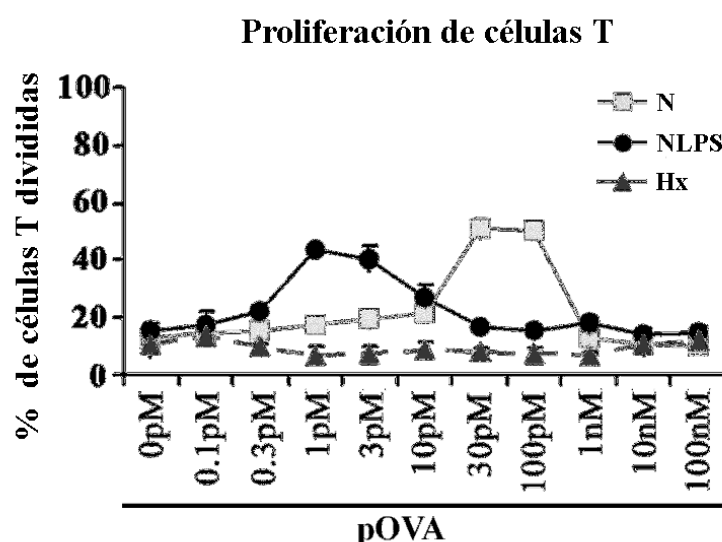


Figura 17. Proliferación de las células T. Los conjugados formados durante 72h, en presencia de diferentes concentraciones de pOVA (0pM-100nM), de macrófagos con células T marcadas con CFSE se usaron para determinar la proliferación de las células T en hipoxia (Hx) y en normoxia, con (NLPS) y sin LPS (N). Los datos se han cuantificado y expresado según el porcentaje de células T divididas, de dos experimentos independientes.

Para dilucidar en qué punto de la activación de las células T la hipoxia inhibe la proliferación de éstas, medimos, mediante citometría de flujo, dos parámetros distintos como son la inducción del receptor de IL-2 (CD25) y la inducción de la actividad reguladora de las células T (T-reg). No observamos cambios significativos en la expresión de CD25 en las células T CD8⁺ tras la formación de conjugados con macrófagos tanto en normoxia como en hipoxia (Figura 18A). Además, localizamos un número insignificante de células T reguladoras, determinado por la expresión alta de

CD25 y Foxp3 positiva, pero que no sufría inducción alguna ni en normoxia ni en hipoxia (Figura 18B).

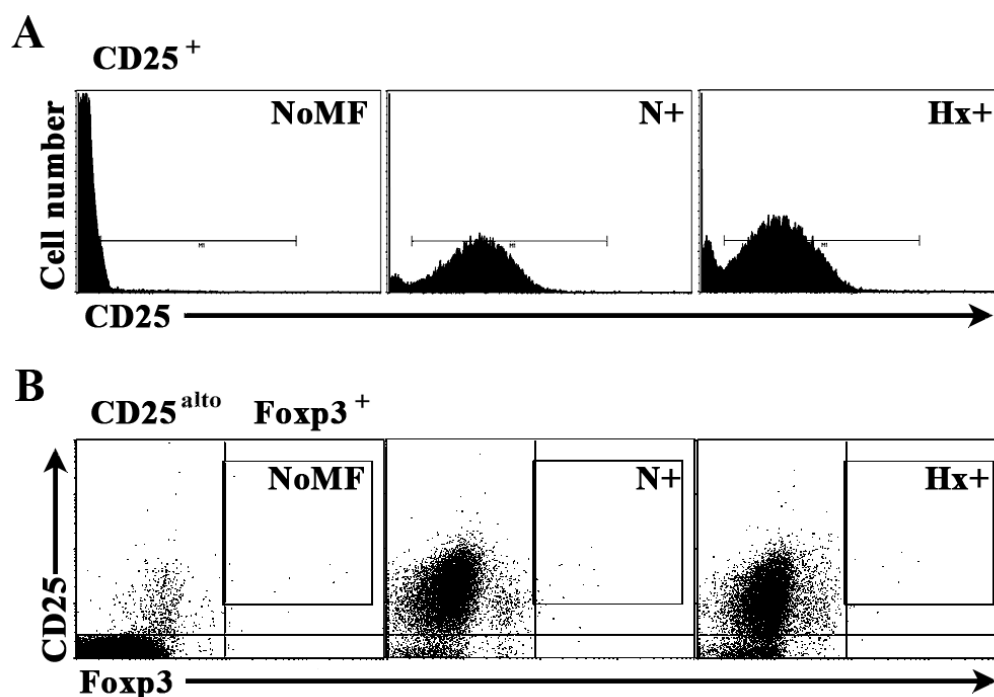


Figura 18. Análisis de la inducción de CD25 y los marcadores de células T reguladoras. A, Determinación de los niveles de CD25⁺, en las células T que formaron conjugados con macrófagos en normoxia (Histograma central) y en hipoxia (histograma derecho). **B,** Determinación de los marcadores de las células T reguladoras.

Nuestros datos indican que los macrófagos cultivados en hipoxia inducen la formación de sinapsis inmunes productivas, que inducen en la célula T tanto señales tempranas de fosforilación como la secreción de citoquinas, sin embargo, los macrófagos no fueron capaces de inducir la expansión clonal de las células T.

1.5. LA HIPOXIA INDUCE LA PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS PRO-INFLAMATORIAS EN MACRÓFAGOS

Anteriormente otros grupos habían relacionado la hipoxia y la producción de citoquinas inflamatorias como el TNF- α , la IL-6 y la IL-8 (Scannell *et al.*, 1993; Naldini *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 2006; Peyssonnaud *et al.*, 2007; Ahn *et al.*, 2008), por lo que nos propusimos analizar cómo afecta la hipoxia a los macrófagos en la producción y secreción de citoquinas.

Los macrófagos se cultivaron durante 40h en normoxia en ausencia (N) o en presencia de LPS (NLPS), y en hipoxia (Hx). El estudio mediante RT-PCR reveló que los macrófagos elicitados del peritoneo inducían tanto el RNA mensajero de IFN- γ como el de IL-12, pero no así el RNA mensajero de IL-18 (Figura 19), mientras que el LPS inducía las tres citoquinas. Sin embargo, ni la hipoxia, ni el LPS indujeron la citoquina anti-inflamatoria IL-10 después de 40h de cultivo.

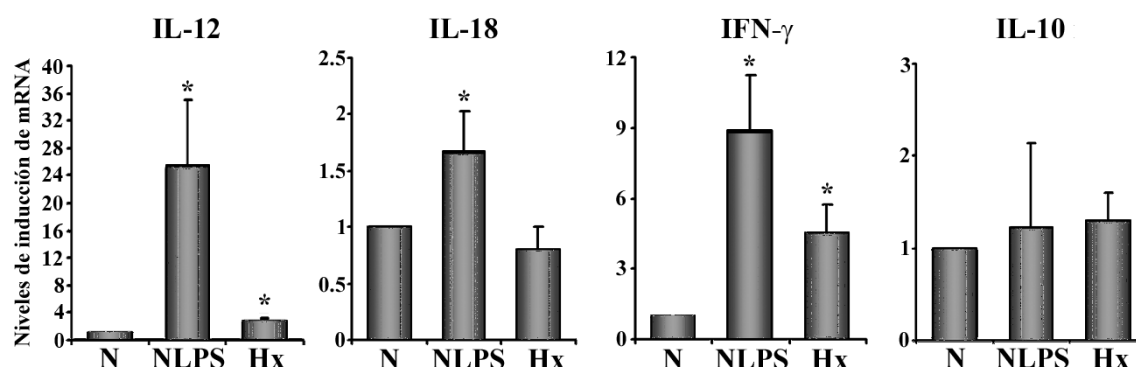
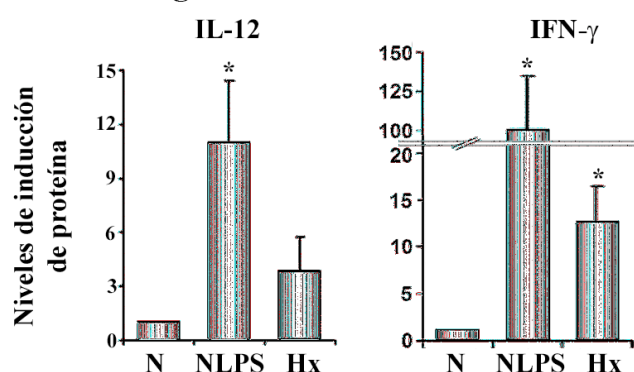


Figura 19. Los macrófagos cultivados en hipoxia inducen el mRNA de IFN- γ e IL-12. Los macrófagos elicitados, provenientes del peritoneo de ratón, fueron cultivados durante 40h en normoxia (N), en normoxia tratados con 10ng/ml de LPS (NLPS), o en hipoxia (Hx), y se analizó, mediante RT-PCR, la inducción de IL-12, IL-18, IFN- γ e IL-10. Los datos, provenientes de cuatro experimentos independientes, muestran la media aritmética de los niveles de mRNA normalizada frente a la normoxia (*, $p < 0,05$).

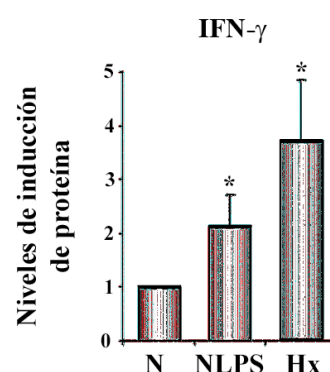
Para corroborar que el aumento en el RNA mensajero, se traduce en un aumento de proteína, analizamos la secreción de IFN- γ y de IL-12, mediante ensayos de ELISA, y observamos que la presencia de ambas proteínas se detectaron en el medio a las 40h de cultivo (Figura 20A). Para descartar que esta secreción fuese causa de la presencia de otro tipo celular presente en el exudado peritoneal, como los neutrófilos, repetimos estos experimentos con las líneas celulares macrofágicas J774A.1, y RAW264.7 obteniendo resultados similares a los anteriores (Figura 20B y Tabla IV).

Hay que resaltar que la secreción de IFN- γ por los macrófagos elicitados del peritoneo en hipoxia es menor que la inducida por los tratados con LPS, esto puede ser debido a que la respuesta de los macrófagos al LPS tiene una cinética distinta que la respuesta a la hipoxia, ya que a 6h detectamos secreción de IFN- γ al medio, mientras que con la hipoxia no se detectó hasta las 40h de cultivo (Figura 20C).

A: Macrófagos Elicitados



B: J774A.1



C

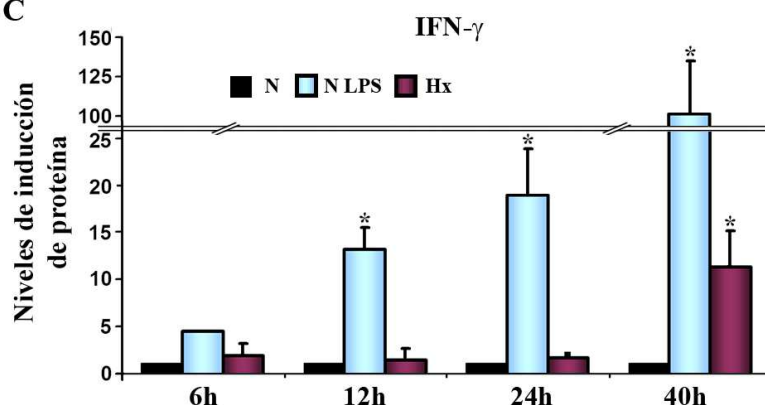


Figura 20. Los macrófagos cultivados en hipoxia secretan IFN- γ e IL-12. **A**, Los macrófagos elicitados fueron cultivados, durante 40h, en normoxia en ausencia (N) o presencia de LPS (NLPS), o en hipoxia (Hx), y mediante ensayos de ELISA, se analizaron sus sobrenadantes para detectar secreción de IFN- γ e IL12. **B**, Niveles de IFN- γ detectados en sobrenadantes de la línea celular J774A.1, cultivadas en condiciones similares. **C**, Cinética de secreción del IFN- γ en los sobrenadantes de macrófagos elicitados de ratón. **A-C**, Los datos provienen de cuatro experimentos independientes y muestran la media aritmética de los niveles de proteína normalizada frente a la normoxia (*, $p < 0,05$).

La producción del IFN- γ fue corroborada utilizando diferentes modelos de macrófagos (Tabla IV):

- En el primero, mediante lavado peritoneal obtuvimos macrófagos residentes del peritoneo del ratón sin elicitar (ya que no han migrado por el estímulo irritante del tioglicolato), y los cultivamos tanto en normoxia como en hipoxia durante 40h.
- En un segundo tipo de ensayo *in vivo*, expusimos a los ratones durante 40h a condiciones de hipoxia (7,5% de O₂) y/o normoxia (21% de O₂), y mediante

lavado peritoneal obtuvimos los macrófagos residentes, en los cuales analizamos directamente el RNA mensajero de IFN- γ .

- En un tercer tipo de ensayo, *in vivo*, inyectamos los ratones con tioglicolato y las últimas 40h expusimos a los ratones a condiciones de hipoxia (7,5% de O₂), y mediante lavado peritoneal obtuvimos los macrófagos elicitados, en los cuales analizamos directamente el RNA mensajero de IFN- γ .

En todos los casos, los macrófagos presentaban una inducción del RNA mensajero del IFN- γ por hipoxia (Tabla IV). Lo que sugiere una implicación directa de la hipoxia en la producción de IFN- γ .

En los experimentos *in vivo*, como control de que el peritoneo del ratón estaba realmente en hipoxia analizamos el RNA mensajero del BNIP-3, que es un gen proapoptótico dependiente de HIF-1 α , observando que también se inducía en respuesta a hipoxia (Tabla IV).

		IFN- γ	BNIP-3
Líneas Celulares	J774A.1	4,62 \pm 0,90	8,62 \pm 0,99*
	RAW264.7	3,55 \pm 0,38	11,17 \pm 1,08
Ex vivo	MF Residentes	2,38	25,9
	MF Elicitados	4,53 \pm 1,23	12,80 \pm 1,12
In vivo	MF Residentes	3,35 \pm 0,97	2,43 \pm 0,16
	MF Elicitados	3,13 \pm 0,65	1,75 \pm 0,49

Tabla IV: Resumen de las inducciones de IFN- γ , en los diferentes modelos. La tabla muestra la media aritmética (normalizada frente a la normoxia) \pm el error estándar de la media. Excepto en los macrófagos (MF) residentes *in vivo*, que muestra la media de 2 experimentos realizados con 4 ratones para cada condición. Como control de la hipoxia se usó BNIP-3 en todos los casos, excepto en la línea celular J774A.1 (*), que se usó PHD-3.

En conclusión, teniendo en cuenta los datos de los macrófagos elicitados, podemos determinar que en hipoxia se inducen y secretan las citoquinas pro-inflamatorias IFN- γ e IL-12, mientras que la citoquina anti-inflamatoria IL-10 permanece constante. Además, con los datos obtenidos con los distintos modelos, demostramos que la hipoxia estimula la producción de IFN- γ . En conjunto estos datos sugieren una implicación directa de la hipoxia en la activación de los macrófagos, a través de la secreción del IFN- γ .

2. MECANISMO DE REGULACIÓN DEL IFN- γ POR HIPOXIA

2.1. LA HIPOXIA MEDIA LA PRODUCCIÓN DE IFN- γ DE MANERA HIF-1 α DEPENDIENTE

Teniendo en cuenta los resultados anteriores en los que la hipoxia potencia las funciones de los macrófagos, determinamos el mecanismo de inducción del IFN- γ por hipoxia y si la ruta canónica de HIF mediaba los efectos observados.

Para que haya transcripción dependiente de HIF-1 α , se requiere la formación de heterodímeros HIF- α/β , para lo cual es necesario que, la subunidad α , que se regula por los niveles de oxígeno, se estabilice y acumule. Para aislar los efectos colaterales de la hipoxia, de los producidos por la transactivación de HIF-1 α , utilizamos agentes químicos que mimetizasen este efecto. Las prolin hidroxilasas de HIF (PHD) como la asparaginil hidroxilasa de HIF (FIH) son dioxigenasas dependientes de hierro (II) y 2-oxoglutarato, y que funcionan como sensores de oxígeno que regulan la actividad de HIF (Bruick and McKnight, 2001; Ivan *et al.*, 2001; Jaakkola *et al.*, 2001). Por ello ensayamos en nuestro modelo celular distintos agentes químicos que bloqueasen su efecto. Dos quelantes de hierro usados típicamente para mimetizar la hipoxia, como son la deferroxamina y el cloruro de cobalto (CoCl₂) (Masson *et al.*, 2001; Safran and Kaelin, 2003), producían un efecto dramático en la morfología de los macrófagos. Sin embargo, la Dimetiloxalilglicina (DMOG), que mimetiza al 2-oxoglutarato y por lo tanto bloquea la acción de las PHDs, no afecta a la morfología de las células y estabiliza HIF- α en normoxia (Milkiewicz *et al.*, 2004; Asikainen *et al.*, 2005).

Cultivamos los macrófagos elicitados de ratón con 100 μ M de DMOG y analizamos la cinética de expresión del RNA mensajero de IFN- γ , así como su secreción. Tanto en las células cultivadas en normoxia y tratadas con DMOG, como en las cultivadas en hipoxia, la inducción del RNA mensajero (Figura 21A) y de la proteína (Figura 21B) del IFN- γ fue significativa a las 40h de cultivo. Estos resultados evidencian que HIF-1 α está implicado directamente a en la inducción de IFN- γ .

También se analizó la expresión de los receptores fagocíticos CD11b, CD18 y CD32/16 (Fc γ R), y de las moléculas de coestimulación CD40 y CD86 en macrófagos elicitados tratados con DMOG y obtuvimos un patrón similar de inducción que cuando los cultivábamos en hipoxia (Figura 21C), excepto con CD11b y CD86, que no se indujeron en respuesta a DMOG. Esto nos sugiere que hay más mecanismos, independientes de HIF-1 α , pero dependientes de hipoxia, que median la inducción de estos receptores.

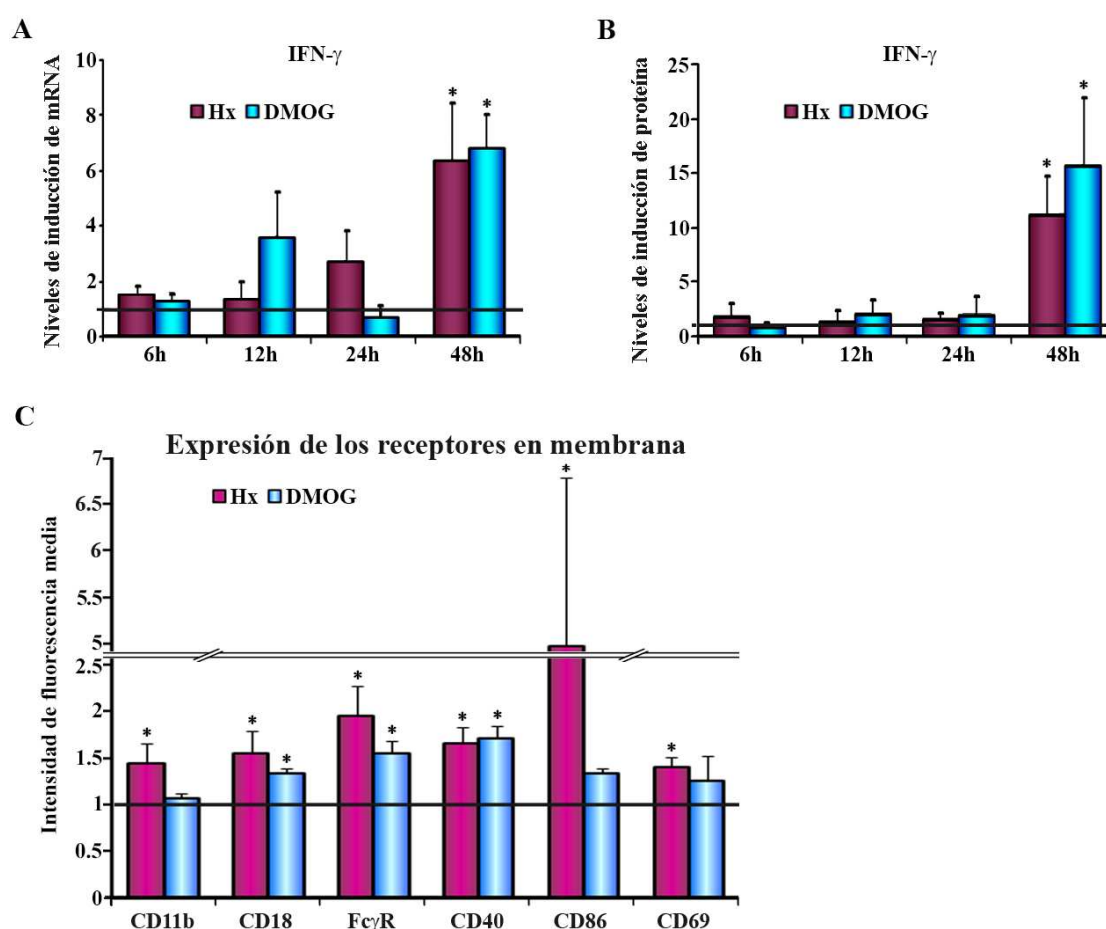


Figura 21. Los macrófagos elicitados tratados con DMOG inducen el mRNA, y la proteína de IFN- γ , y aumentan la expresión en membrana de CD18, Fc γ R, CD40, CD86 y CD69. **A-B**, Cinética de inducción del IFN- γ en el tiempo, tanto a nivel de mRNA (**A**), como a nivel de proteína (**B**), de macrófagos elicitados cultivados en hipoxia (Hx) y en normoxia tratados con 100 μ M de DMOG (DMOG). Los datos muestran la inducción de IFN- γ normalizados frente a la normoxia de tres experimentos independientes (*, $p < 0,05$). **C**, Media aritmética (normalizada frente a la normoxia), de la intensidad de fluorescencia media, de CD11b, CD18, Fc γ R, CD40, CD86 y CD69. Los datos provienen de cuatro experimentos independientes (*, $p < 0,05$).

Para corroborar el papel directo de HIF-1 α en la inducción de IFN- γ , silenciamos HIF-1 α mediante RNA de interferencia (siHIF) en la línea macrófagica RAW264.7 y la cultivamos en hipoxia. Después de 40h de interferencia comprobamos que la inducción de la proteína de HIF-1 α en hipoxia estaba claramente reducida, en comparación con las células transfectadas con un RNA control (siSCR) (Figura 22A). En estas condiciones observamos que la inducción del RNA mensajero de IFN- γ al 1% de O₂ se reducía considerablemente (Figura 22B) al igual que ocurriría con un gen típico dependiente de HIF-1 α (BNIP-3) (datos no mostrados) (Gu *et al.*, 1998; Sowter *et al.*, 2001). Estos resultados sugieren que la presencia de HIF-1 α es necesaria para la inducción del RNA mensajero de IFN- γ .

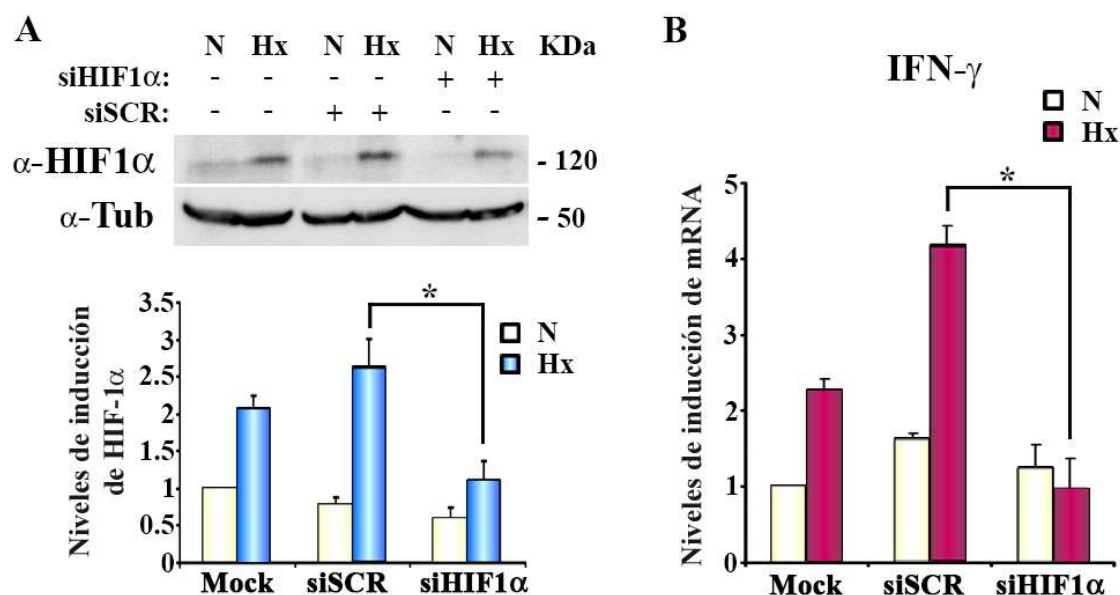


Figura 22. El silenciamiento de HIF-1 α conlleva la pérdida de inducción de IFN- γ por hipoxia en RAW264.7. Las células se transfectaron con un iRNA control (siSCR), y con un iRNA frente a HIF-1 α (siHIF), o no se transfectaron (mock). **A**, Niveles de proteína de HIF-1 α después de la transfección y de cultivarlas en normoxia o en hipoxia (*paneles superiores*). El análisis densitométrico (*panel inferior*) muestra la media de los niveles normalizados de HIF-1 α de tres experimentos independientes (*, $p < 0,05$).

0,05). **B**, Media aritmética de tres experimentos independientes (*, $p < 0,05$), de la inducción del mRNA de IFN- γ de las células transfectadas y expuestas a normoxia o hipoxia.

El requerimiento de HIF-1 α en la inducción del IFN- γ fue corroborado *in vivo* mediante el uso de los ratones transgénicos para HIF-1 α (Cramer *et al.*, 2003; Peyssonnaud *et al.*, 2005). Teniendo en cuenta que la delección total de HIF-1 α en el organismo es letal en estado embrionario, se usaron ratones que deleccionaban HIF-1 α selectivamente en el tejido mieloide. Para ello se utilizó el sistema Cre/LoxP por el cual la recombinasa Cre reconoce 2 secuencias LoxP y elimina el DNA flanqueado (Figura 22). Se obtuvieron ratones transgénicos Cre en los que se había insertado el gen de la recombinasa cre delante del promotor específico de tejido mieloide Lisozima M (wt-LysMCre) (Clausen *et al.*, 1999), y ratones en los que el exón 2 del gen de HIF-1 α estaba flanqueado por secuencias loxP. Mediante el cruce de ambas líneas de ratones obtuvimos los ratones HIF-1 α flox^{+/+} LysMCre, en los que se había suprimido HIF-1 α de manera específica en la línea mieloide (Figura 23).

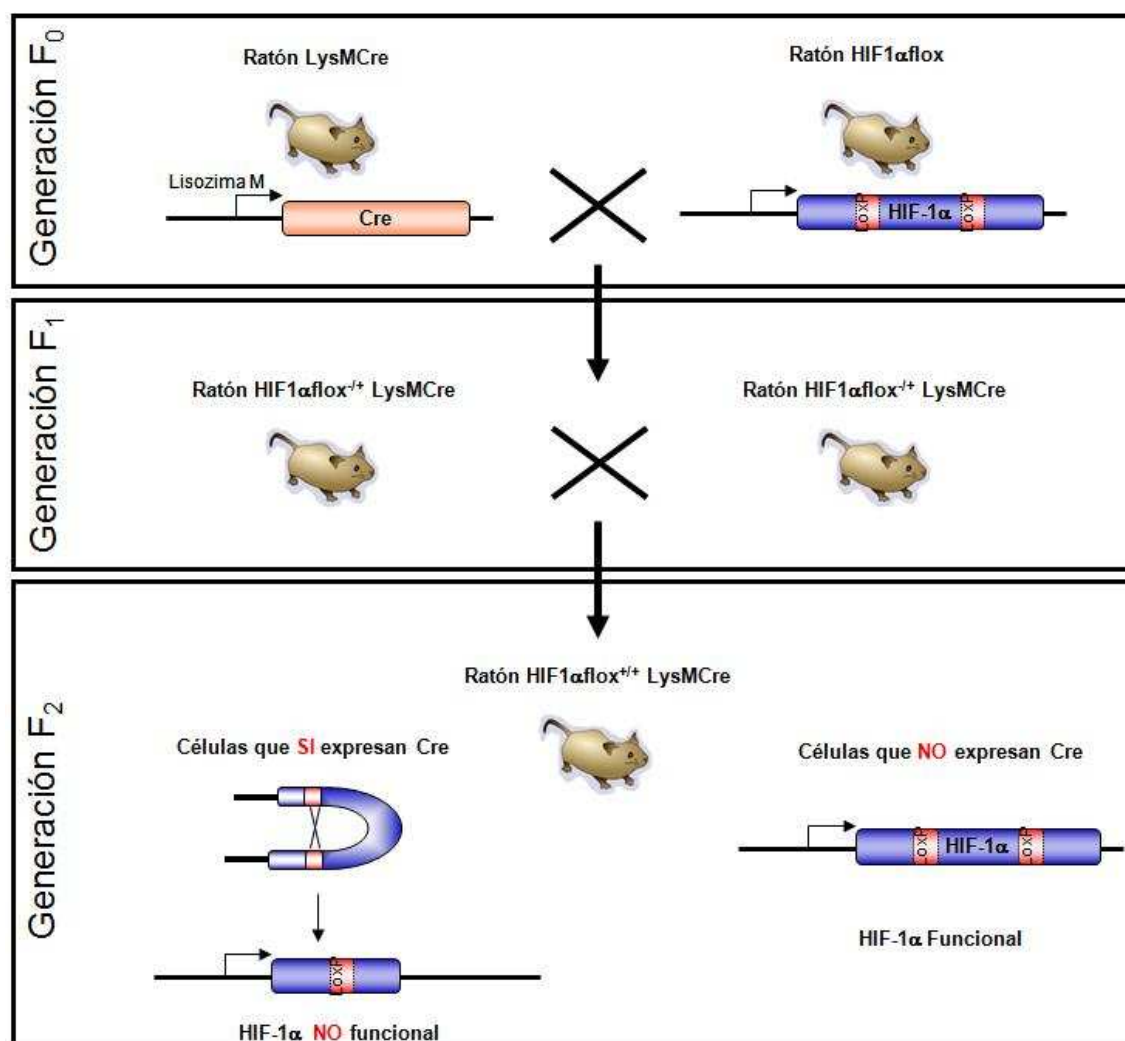


Figura 23. Generación de los ratones HIF-1 α lox LysMCre. En la generación F₀, cruzamos ratones LysMCre, con ratones HIF-1 α lox y obtuvimos ratones HIF-1 α lox^{+/+} LysMCre (generación F₁). Cruzamos los ratones de la generación F₁, para obtener los ratones HIF-1 α lox^{+/+} LysMCre que usamos para aislar los macrófagos peritoneales HIF-1 α ^{-/-}.

Mediante el genotipaje de los ratones de la generación F₂ se determinaron los ratones HIF-1 α flox^{+/+} LysMCre. Se realizó una biopsia de la cola de los ratones para extraer el DNA, que se amplificó mediante PCR (Figura 24): a) para analizar si tienen la recombinasa Cre con los oligonucleótidos MLys y Cre (Tabla I). b) y para analizar si el exón 2 de HIF-1 α está flanqueado con las secuencias *LoxP* en ambos cromosomas (oligonucleótidos específicos en la tabla I). En este sentido, podíamos tener ratones homocigotos positivos para *LoxP* de HIF-1 α (HIF-1 α LoxP^{+/+}), homocigotos negativos (HIF-1 α LoxP^{-/-}), y heterocigotos (HIF-1 α LoxP^{+/-}). La diferencia entre los positivos y negativos son 40pb, debidos a la secuencia *LoxP*.

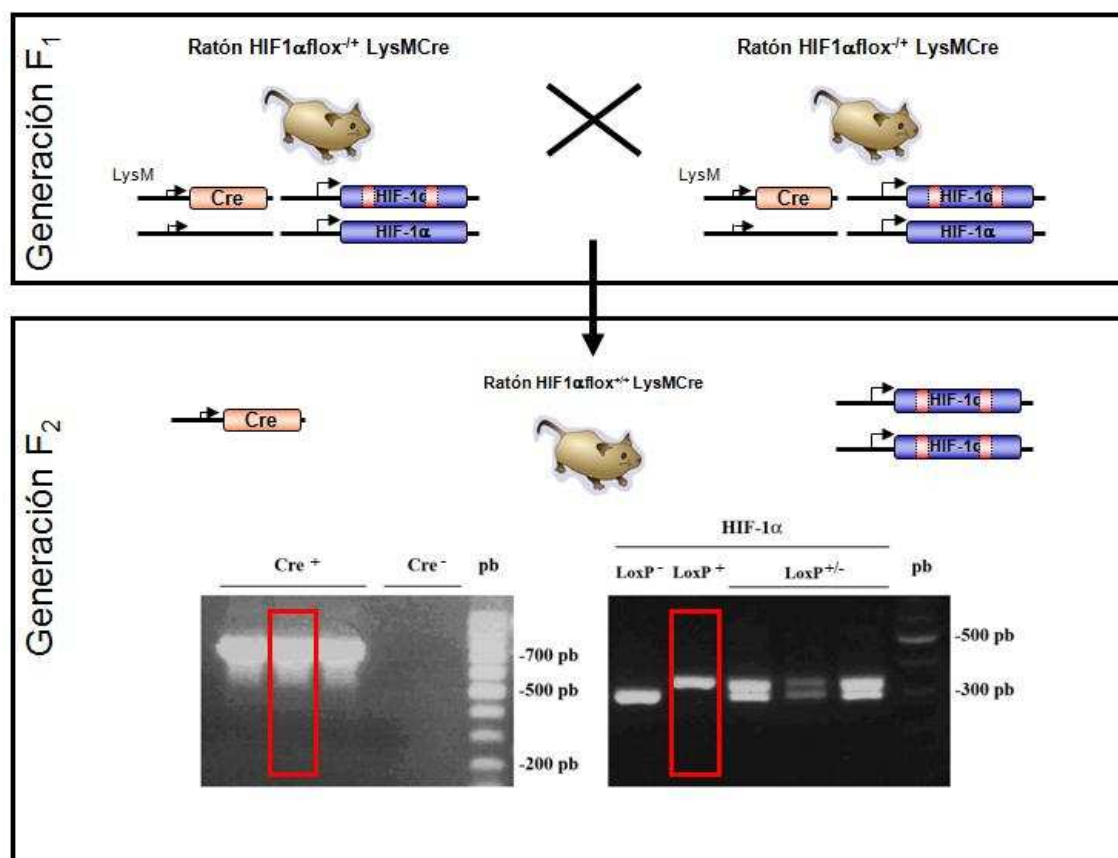


Figura 24. Genotipaje de los ratones transgénicos. Los ratones HIF1 α lox^{+/+}LysMCre (Ratones *Cre*⁺ y *LoxP*⁺) se encuentran señalados con un recuadro rojo

Estos ratones que expresaban la recombinasa Cre, bajo el promotor de la lisozima M, y presentaban HIF-1 α flanqueado por secuencias *LoxP* en ambos cromosomas y por lo tanto no expresan HIF-1 α funcional en la línea mieloide, fueron los utilizados en nuestros experimentos.

Aislamos mediante lavado peritoneal, los macrófagos residentes en el peritoneo tanto de los ratones LysMCre, como de los ratones HIF-1 α lox^{+/+}LysMCre, así como de los ratones C57BL/6 control, que habían sido expuestos a normoxia o hipoxia durante 40 horas. Los macrófagos residentes en los que se ha delecionado HIF-1 α de manera constitutiva (provenientes de los ratones HIF-1 α lox^{+/+}LysMCre), no inducían la transcripción del RNA mensajero del IFN- γ (Figura 25) cuando los ratones se mantuvieron en hipoxia, mientras que los macrófagos aislados tanto de los ratones LysMCre así como de los ratones C57BL/6 control, sí que fueron capaces de inducir el RNA de IFN- γ . Como control de que realmente no se inducían genes dependientes de HIF-1 α , se comprobó que los macrófagos peritoneales extraídos de los ratones HIF-1 α lox^{+/+}LysMCre no inducían BNIP-3 (Figura 24).

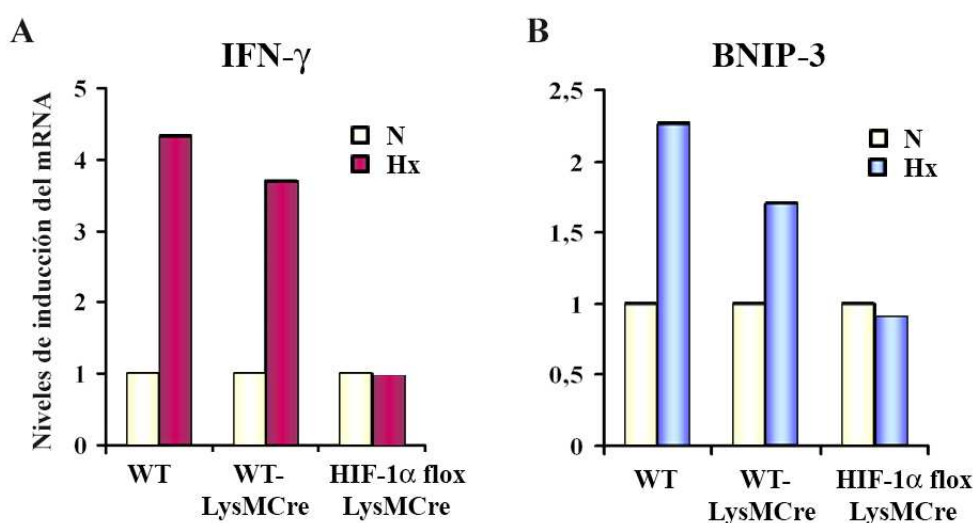


Figura 25. HIF-1 α media la inducción de IFN- γ por hipoxia. Análisis de los niveles de RNA mensajero de BNIP-3 (*panel izquierdo*) e IFN- γ (*panel derecho*) en los macrófagos residentes aislados de ratones transgénicos en los que se ha delecionado HIF-1 α en el linaje mieloide. Los datos provienen de un pool de 3 ratones.

En conjunto estos resultados confirman genéticamente la implicación de HIF-1 α en la inducción del IFN- γ en hipoxia.

2.2. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL ELEMENTO DE RESPUESTA A HIPOXIA DE IFN- γ

Como consecuencia de los resultados anteriores, buscamos elementos de respuesta a hipoxia (HRE) en el promotor del gen de *IFN- γ* . Esta búsqueda la realizamos con una matriz informática realizada por Luís del Peso y col (Pescador, 2007), que localiza y clasifica los distintos HRE presentes en el genoma, en base a su conservación y al contexto nucleico en el que se encuentra el núcleo central ACGT de unión de HIF. Localizamos dos posibles HRE en el promotor del *IFN- γ* . Sólo uno de ellos estaba conservado en diferentes especies de mamíferos (Figura 26), y se localizaba en una región muy conservada entre la posición -14 a -69 respecto al sitio de inicio de la transcripción.

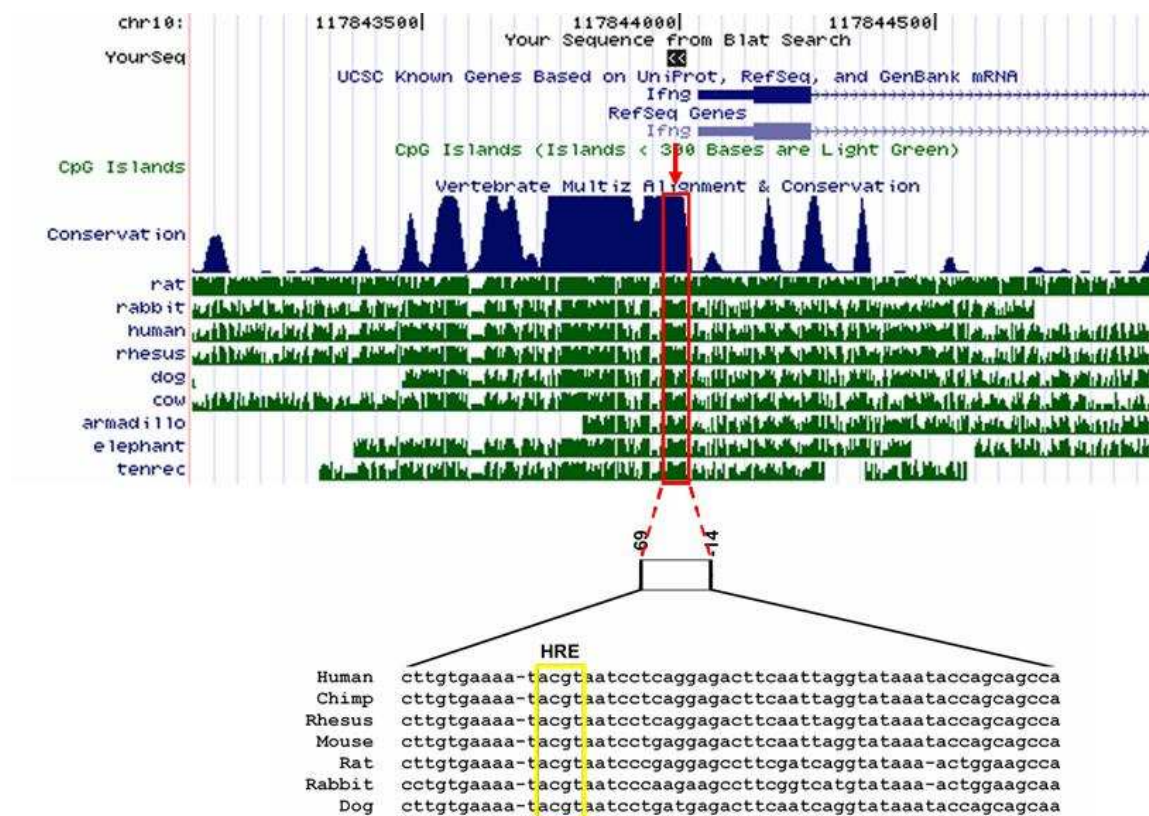


Figura 26. Región genómica de IFN- γ (UCSC Genome Browser, <http://genome.ucsc.edu>). La homología entre las diferentes especies está representada por el histograma verde, y las secuencias conservadas entre las diferentes especies están indicadas en las secuencias inferiores. La localización del HRE en la región genómica de IFN- γ está recuadrada.

Para comprobar que HIF-1 α era capaz de unirse al nuevo sitio HRE localizado, llevamos a cabo experimentos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) sobre macrófagos elicitados cultivados en normoxia o hipoxia durante 6h. La cromatina fue inmunoprecipitada con anticuerpos anti-HIF-1 α , y la unión de HIF-1 α al HRE fue identificada por PCR con oligonucleótidos específicos para la secuencia del promotor de *IFN- γ* susceptible de estudio (Ver Tabla III). Observamos que la proteína HIF-1 α endógena estaba unida al HRE, localizado en el promotor de *IFN- γ* , en hipoxia (Figura 27), mientras que esta unión no la observamos en normoxia. Este resultado fue confirmado con las líneas celulares J774A.1 y RAW264.7 (datos no mostrados), lo que sugiere que el HRE localizado es una secuencia de unión de HIF-1 α , que responde a hipoxia *in vivo*.

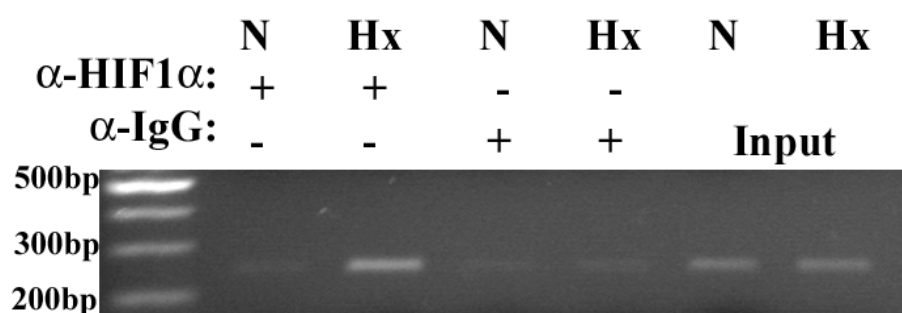


Figura 27. HIF-1 α se une *in vivo* a la secuencia reguladora en hipoxia de *IFN- γ* . Los lisados de los macrófagos elicitados se inmunoprecipitaron con el control de IgGs (IgG) y un anticuerpo policlonal anti-HIF-1 α . El DNA co-inmunoprecipitado fue amplificado con los oligonucleótidos específicos para la secuencia del HRE de *IFN- γ* (oligonucleótidos 1 y 2 Tabla III). El input es DNA genómico fragmentado antes obtenido antes de la inmunoprecipitación.

Con objeto de analizar si la unión de HIF-1 α al HRE del promotor de *IFN- γ* era funcional, clonamos la región promotora situada entre -848 y -22 respecto al sitio de inicio de la transcripción del gen murino de *IFN- γ* , en un plásmido de expresión del gen testigo de la *luciferasa* de luciérnaga (p*IFN- γ* -Luc). Este plásmido, que contenía la región genómica con los dos posibles HRE, se transfectó en la línea celular RAW264.7. La expresión de luciferasa de esta construcción se indujo aproximadamente una media de 3 veces en las células cultivadas en condiciones de hipoxia en comparación con normoxia (Figura 28A). Como control positivo, transfectamos en paralelo una construcción con la secuencia que contiene el HRE de PHD-3 (pPHD3-Luc) (Pescador *et al.*, 2005) que también se indujo una media de 7 veces en hipoxia con respecto a normoxia (Figura 28B).

Para confirmar que el HRE localizado, presente en esta secuencia, era responsable de la activación transcripcional del IFN- γ en respuesta a hipoxia, generamos otra construcción en la que mutamos el núcleo central ACGT a TAGC (pIFN γ Mut-Luc) del HRE más conservado (Figura 26). Esta construcción mutada de IFN- γ no fue capaz de inducir la expresión de luciferasa en condiciones de hipoxia (Figura 28A), lo que nos indicó que el HRE localizado era transcripcionalmente activo. Del mismo modo, la construcción control de PHD-3 con la misma mutación (pPHD3Mut-Luc) (Pescador *et al.*, 2005) no se indujo en hipoxia.

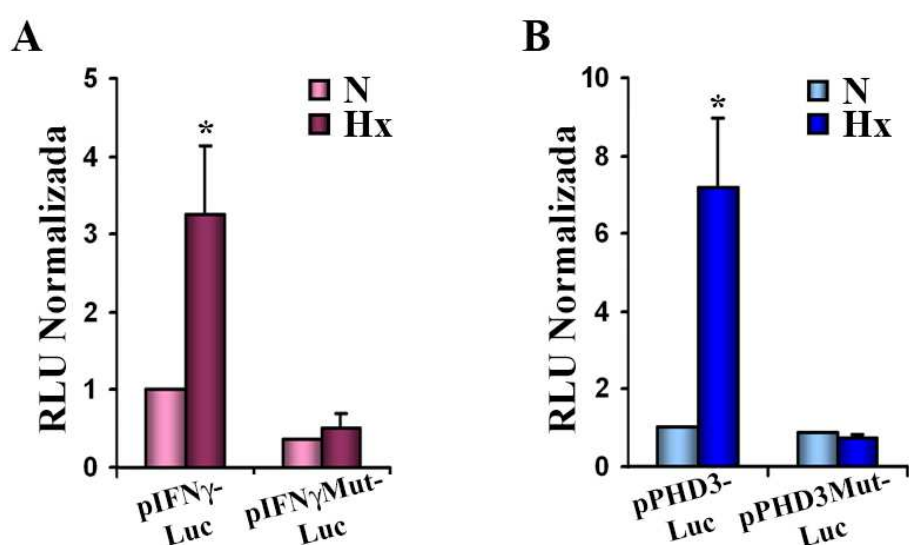


Figura 28. El HRE localizado en el promotor de IFN- γ es inducido en hipoxia. La línea celular RAW 264.7 fue nucleofectada con las diferentes construcciones con el gen testigo de la luciferasa. Después de la nucleofección las células se cultivaron en condiciones de normoxia (N) o Hipoxia (Hx) durante 24h antes del análisis de los niveles de luciferasa. Media aritmética de los valores normalizados frente a la normoxia de las unidades relativas de luciferasa (RLU) obtenidas de RAW264.7 nucleofectadas con las construcciones que contienen el HRE localizado en la región promotora **A**, de IFN- γ (pIFN γ -Luc) y su forma mutada (pIFN γ Mut-Luc). **B**, de PHD-3 (pPHD3-Luc) y su forma mutada (pPHD3Mut-Luc). **A-B**, La media aritmética proviene de cinco experimentos independientes (*, $p < 0,05$).

En conjunto, estos resultados demuestran que los macrófagos en hipoxia inducen IFN- γ mediante la unión de HIF-1 α al HRE localizado en el promotor de IFN- γ . Además, hemos descrito que este HRE es funcional y transcripcionalmente activo.

2.3. EL IFN- γ INDUCIDO POR HIF-1 α EN HIPOXIA ES EL RESPONSABLE DEL INCREMENTO DE LA FORMACIÓN DE SINAPSIS INMUNOLÓGICAS PRODUCTIVAS Y DEL AUMENTO DE LA CAPACIDAD FAGOCÍTICA

Teniendo en cuenta los datos anteriores que indican que HIF-1 α regula la producción de IFN- γ en hipoxia, evaluamos el papel directo de HIF-1 α y del IFN- γ en la formación de las sinapsis inmunes y en la actividad fagocítica de los macrófagos en respuesta a hipoxia.

Los macrófagos peritoneales de ratón fueron transfectados con RNAs de interferencia frente a HIF-1 α (siHIF-1 α) o frente a IFN- γ (siIFN- γ), y los cultivamos tanto en normoxia como en hipoxia. Observamos que el siIFN- γ reducía notablemente el RNA mensajero de IFN- γ , e interesantemente cuando interferíamos HIF-1 α con siHIF-1 α también se perdía la inducción del IFN- γ , en un 85-90% (Figura 29A). Confirmamos la interferencia de HIF-1 α analizando los niveles del RNA mensajero de BNIP-3 (60% de reducción), en comparación con los macrófagos transfectados con el control (siSCR) en hipoxia (Figura 29B).

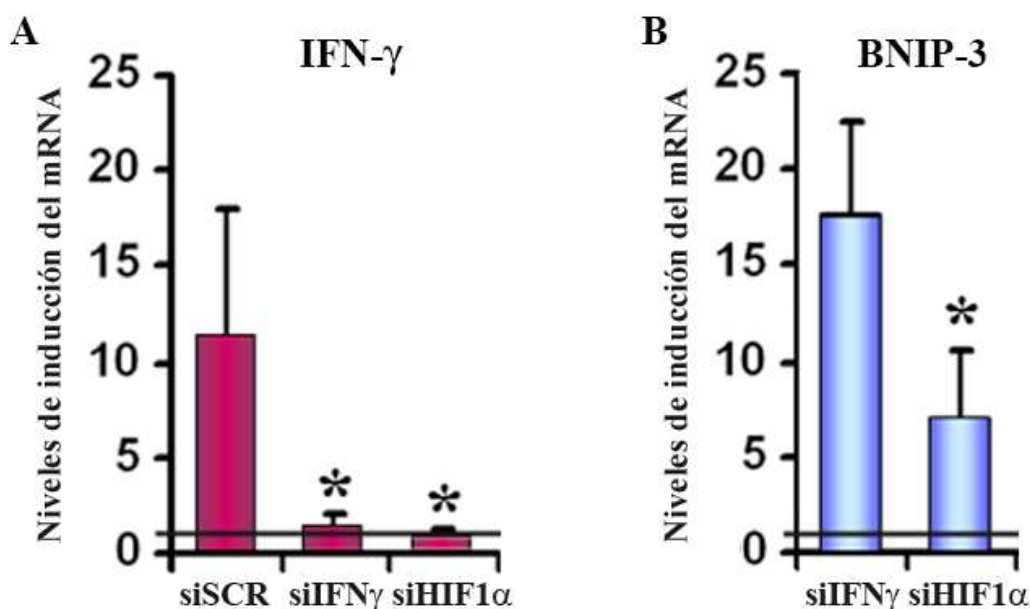


Figura 29. El silenciamiento de HIF-1 α conlleva la pérdida de inducción de IFN- γ por hipoxia en macrófagos elicitados. Los macrófagos elicitados fueron transfectados con un iRNA control (siSCR), con

un iRNA contra IFN- γ (siIFN), y con un iRNA contra HIF-1 α (siHIF). Posteriormente se cultivaron en normoxia (N) y/o hipoxia (Hx) durante 40h. **A**, Niveles normalizados frente a la normoxia del mRNA de IFN- γ . **B**, Niveles normalizados frente a la normoxia del mRNA de BNIP-3. **A-B**, Los datos muestran la media aritmética de HIF-1 α de cuatro experimentos independientes (*, $p < 0,05$).

En estas condiciones realizamos ensayos de fagocitosis tanto por vía CR (Figura 30A) y como por vía Fc γ R (Figura 30B), observamos que al transfectar los macrófagos tanto con siHIF-1 α como con siIFN- γ no se producía el aumento de unión y de internalización de las partículas opsonizadas observado en el control de hipoxia (siSCR) (Figura 30), en comparación con normoxia.

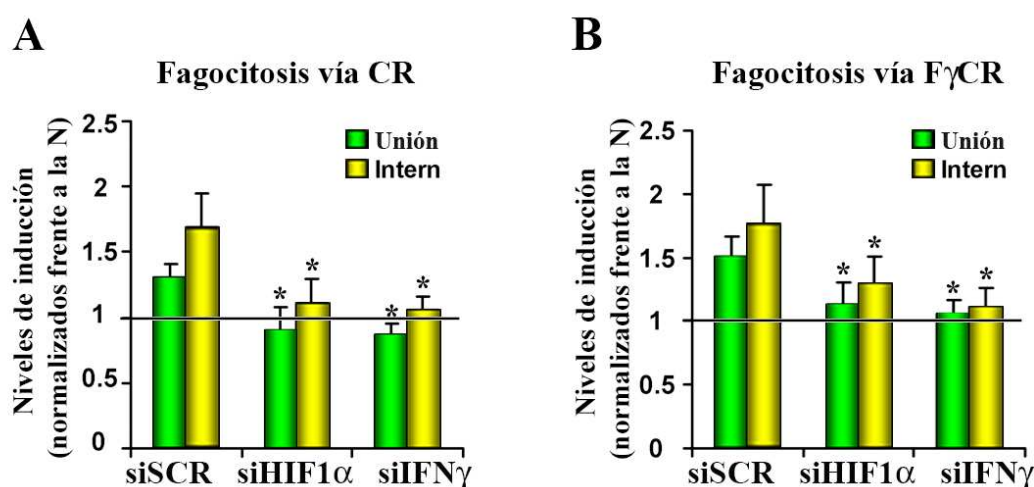


Figura 30. El silenciamiento de HIF-1 α como el de IFN- γ , inhibe el aumento de unión e internalización observado en hipoxia. Con las mismas condiciones que en la Figura 27, se realizaron los ensayos de fagocitosis. Para lo cual las células interferidas fueron fijadas y teñidas con anti-F-actina y anti-SRBC. **A**, Cuantificación de la unión e internalización de SRBCs, vía CR. **B**, Cuantificación de la unión e internalización de SRBCs, vía Fc γ R. **A-B**, Los datos muestran las medias aritméticas de unión o internalización, normalizadas frente a la normoxia, y provienen de tres experimentos independientes (*, $p < 0,05$).

Además, realizamos ensayos de presentación antigénica a células T CD8+ específicas para el péptido OVA₂₅₇₋₂₆₄, provenientes de ratones OT-I y se determinó la eficiencia de las sinapsis inmunes formadas, a bajas tensiones de oxígeno. Para ello, analizamos la conformación activa del TCR/CD3 ϵ en los conjugados macrófagos transfectados-células T CD8+, mediante inmunofluorescencia con el anticuerpo específico APA 1/1 (Risueno *et al.*, 2005; Risueno *et al.*, 2006).

El aumento de la inducción que observábamos en la conformación activa del TCR/CD3 ϵ (siSCR) por hipoxia, se perdía casi por completo, cuando transfectábamos los macrófagos con RNA de interferencia contra HIF-1 α (siHIF1 α) o IFN- γ (siIFN γ) (Figura 31).

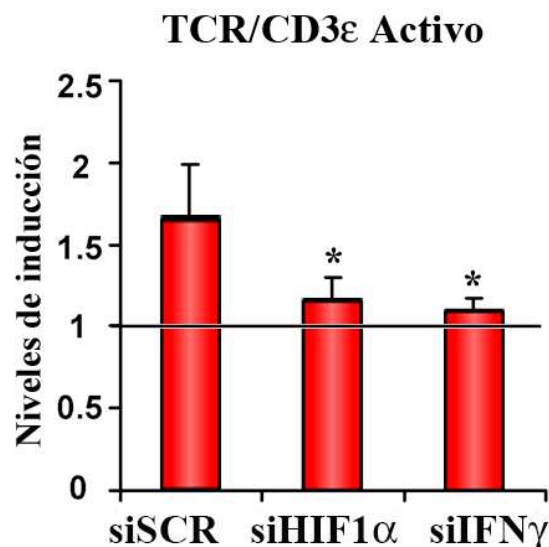


Figura 31. El silenciamiento de HIF-1 α como el de IFN- γ , produce un descenso en los niveles de TCR/CD3 ϵ activo. Los macrófagos elicitados fueron transfectados con iRNA control (siSCR), iRNA frente a IFN- γ (siIFN γ), y con un iRNA frente a HIF-1 α (siHIF1 α). Se cultivaron en normoxia (N) y/o hipoxia (Hx) durante 40h. Los conjugados macrófago-células T se formaron y procesaron de manera similar a la Figura 13. Se cuantificó el número de células T con un TCR/CD3 ϵ activo reclutado en el sitio de contacto. El dato muestra la media aritmética de los niveles de inducción normalizados frente a la normoxia de tres experimentos independientes (*, $p < 0,05$).

Estos datos demuestran que HIF-1 α media la inducción de IFN- γ por hipoxia, y que esta inducción es responsable de la respuesta activadora de los macrófagos: tanto del aumento de la fagocitosis tanto por vía CR, como por vía Fc γ R, así como del aumento en la formación sinapsis inmunes productivas con las células T.

DISCUSIÓN

En los procesos de daño tisular, el epitelio, que tiene la función de proporcionar una barrera física para limitar la invasión de microorganismos, se puede ver alterado tanto por causas mecánicas como por lesiones inflamatorias. Estas alteraciones consisten en cambios de permeabilidad del endotelio vascular, seguido de la activación y la invasión de las células del sistema inmune, iniciándose así el proceso inflamatorio para hacer frente a las posibles infecciones debidas a la invasión de patógenos, tanto víricos como bacterianos.

La inmediata aparición de neutrófilos en el lugar de la lesión es seguida por la infiltración de los macrófagos. Estos macrófagos juegan un papel clave en la coordinación de la respuesta inmune y sirven de conexión entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa (Figura 32), ya que están equipados con una gran variedad de estructuras moleculares, que les permite reconocer partículas, fagocitarlas e inducir un programa complejo que está diseñado para eliminarlas y presentar fragmentos claves a las células T.

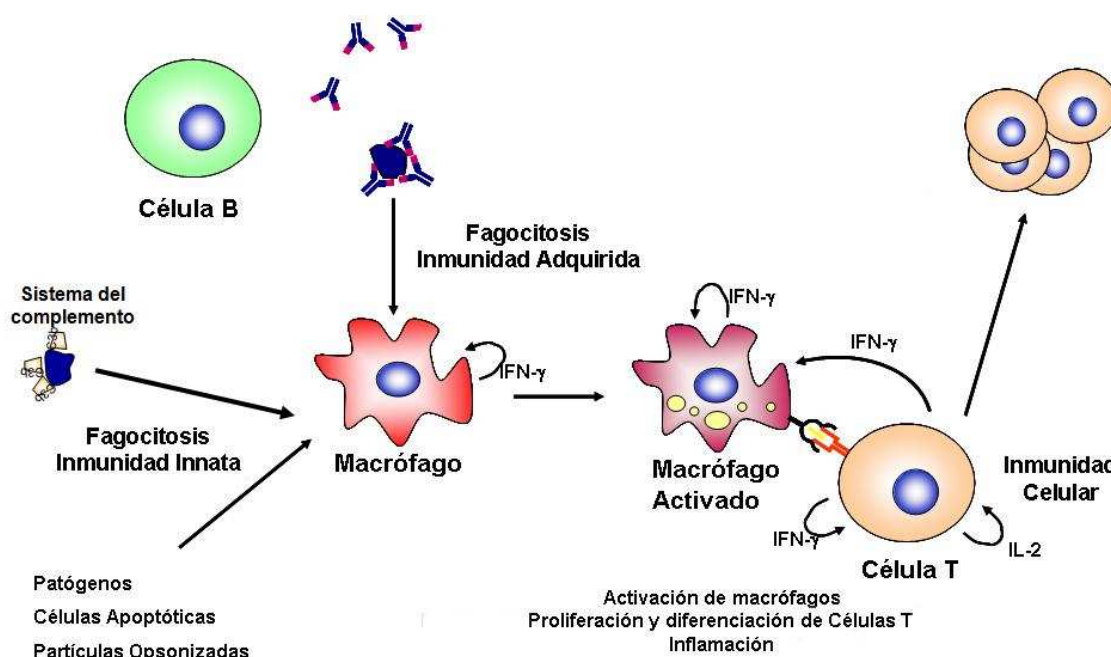


Figura 32. Funciones de los macrófagos en la inmunidad

Esta respuesta inflamatoria normalmente se produce en microambientes de hipoxia, ya que el suministro de sangre se ve disminuido por la oclusión de los vasos sanguíneos (Sitkovsky and Lukashev, 2005). Por ello, es necesario que las células inmunes se adapten a la reducción de oxígeno para que sean capaces de eliminar los agentes patógenos de una manera rápida y eficaz.

Nuestros datos demuestran que la falta de oxígeno favorece a los macrófagos a fagocitar partículas opsonizadas. En este sentido, se pensaba que la hipoxia podría estar implicada en un efecto inhibitorio de la actividad fagocítica, ya que esta requiere oxígeno para la actividad microbica, tanto para la producción de las especies reactivas de oxígeno como para el superóxido (Babior, 1984; Du *et al.*, 1998; Babior, 2000), además, el oxígeno es necesario, indirectamente, para la actividad de la enzima lisosomal (Segal *et al.*, 1981). Sin embargo, otros trabajos demuestran que la hipoxia, a través de HIF-1 α , está favoreciendo un aumento de la capacidad fagocítica (Anand *et al.*, 2007), lo que está en concordancia con nuestros datos. Así mismo, se ha demostrado que en ausencia de HIF-1 α la capacidad microbica de los macrófagos se ve claramente comprometida y aunque el ratio de fagocitosis no se ve afectado, los macrófagos HIF-1 α ^{-/-} no son capaces de destruir los patógenos fagocitados (Cramer *et al.*, 2003; Peyssonnaud *et al.*, 2005), lo que apunta a una implicación de HIF-1 α en el aumento de la capacidad microbica. Además, estudios realizados, con macrófagos peritoneales tras varios pulsos de hipoxia-reoxigenación, muestran un aumento en la fagocitosis por la vía de los receptores de Fc (FcR) (Anand *et al.*, 2007). Nuestros datos también indican un aumento en el porcentaje de fagocitosis por hipoxia, pero no sólo por vía FcR, sino también por la vía de los receptores de complemento (CR). Además, hemos observado una regulación positiva dependiente de hipoxia, en la expresión de los receptores fagocíticos CD11b, CD18, y Fc γ R. En este sentido, se ha publicado que la hipoxia aumenta la expresión de CD11b y CD18 en neutrófilos (Scannell *et al.*, 1995b; Simms and D'Amico, 1995). Estos aumentos en la expresión en membrana de CD11b, CD18, y Fc γ R podría explicar, al menos en parte, el aumento de unión de SBRC detectado en los ensayos de fagocitosis realizados a bajas tensiones de oxígeno con estos macrófagos. En cambio, la internalización de otros patógenos que no han sido opsonizados, ocurre con la misma eficiencia independientemente de los niveles de oxígeno, aunque no se sabe si la expresión de los receptores involucrados en estas vías fagocíticas podría estar regulada a través de la hipoxia.

Se ha propuesto un mecanismo a través de p38-MAPK y HIF-1 α , por el cual los macrófagos a bajas tensiones de oxígeno son capaces de fagocitar tanto *in vitro* como *in vivo* (Cramer *et al.*, 2003; Anand *et al.*, 2007). P38 actuaría sobre el aumento de expresión de HIF-1 α , y este regularía la fagocitosis, ya que tanto la inhibición de p38, como el silenciamiento de HIF-1 α producen una bajada en la fagocitosis observada tras el tratamiento de hipoxia-reoxigenación. En este sentido, en el presente trabajo

hemos propuesto un mecanismo diferente de potenciación de la actividad fagocítica, por el cual, macrófagos que se han cultivado exclusivamente en hipoxia y en ausencia de cualquier otro estímulo, inducen la producción de IFN- γ , que al ser bloqueado mediante RNA de interferencia, provoca una reducción a los niveles basales, observados en normoxia, en la fagocitosis tanto por vía CR, como por vía FcR. Además, hemos demostrado que la inducción de IFN- γ , es dependiente de la estabilización de HIF-1 α mediada por hipoxia.

Nuestros resultados indican que en ausencia de estímulo, los macrófagos cultivados a bajas tensiones de oxígeno, son más eficientes presentando antígenos, que los cultivados en normoxia. En este sentido, los macrófagos activados por la hipoxia aumentaron la expresión en membrana de moléculas co-estimuladoras y de presentación antigénica tales como CD40, CD86 y MHC-I. Esta inducción es dependiente de HIF-1 α , ya que al tratar las células con DMOG, que estabiliza HIF-1 α en normoxia, se reproducen estos aumentos en la expresión de CD40 y CD86. Estos resultados sugieren que la bajada en las tensiones de oxígeno en un tejido, como consecuencia de un proceso inflamatorio, podría estar preparando a los macrófagos para responder de una manera rápida y eficaz.

Ya que los macrófagos coordinan la inflamación y junto con las células dendríticas sirven de conexión entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa (Figura 32), en el presente trabajo hemos demostrado que cuando las células T entran en juego y se ponen en contacto con macrófagos activados por hipoxia y en presencia de un antígeno específico, se produce una potente respuesta de células T, que culmina en la producción de las citoquinas IFN- γ e IL-2. Para que se produzca un incremento en la eficiencia de la producción del IFN- γ y la IL-2 por la célula T, se requiere que haya una serie de eventos tempranos durante la sinapsis inmune.

En las células T la ocupación del TCR produce un cambio conformacional de éste, e induce la activación de tirosinas quinasas que van a fosforilar las regiones ITAM de las cadenas ζ del CD3/TCR y de la molécula de señalización proximal del TCR, LAT, además de la translocación del MTOC al sitio de contacto, iniciándose así una compleja cascada de señalización. Nuestros datos indican que las células T en contacto con macrófagos, cultivados a bajas tensiones de oxígeno, aumentan la conformación activa del TCR/CD3 ϵ , así como aumentan la fosforilación de la cadena ζ del complejo TCR/CD3 y de LAT en la tirosina 195. Además, hemos demostrado que

tras bloquear la expresión de HIF-1 α , no se produce el aumento en la conformación activa del TCR/CD3 ϵ , observado en las células T que han contactado con macrófagos cultivados en hipoxia. Lo que indica que HIF-1 α media la capacidad de los macrófagos de potenciar la activación de las células T.

Los procesos de activación de las células T normalmente culminan no sólo con la secreción de citoquinas sino también con la expansión clonal. Sin embargo, no hemos detectado la proliferación de células T tras el contacto con macrófagos en condiciones de hipoxia. Varios estudios indican que la hipoxia bloquea la proliferación de las células T, proponiendo que este bloqueo en la proliferación podría deberse a la inhibición de la progresión del ciclo celular, ya que la hipoxia controla la expresión de varios genes implicados en el ciclo celular como la ciclina CDC25, o CDKN1A, (Hammer, 2007 # 1698; Koshiji, 2004 # 1697). Así mismo, se ha descrito que las células T en hipoxia se silencian para controlar los daños colaterales a través de la inducción de una isoforma alternativa de HIF-1 α denominada I.1, que actúa como dominante negativo e impide la activación de la célula T (Lukashev, 2006 # 261; Lukashev, 2007 # 1527; Thiel, 2007 # 1648). También se ha descrito que la hipoxia afecta al canal de potasio Kv 1.3 que está implicado directamente en el proceso de activación y proliferación de las células T (Robbins *et al.*, 2005; Szigligeti *et al.*, 2006). En este sentido, hemos obtenido datos preliminares de células T que se han puesto en contacto en normoxia con macrófagos cultivados en hipoxia, y que sí se expanden clonalmente, sin embargo se necesitaría un estudio más detallado.

La búsqueda del mecanismo para explicar cómo los macrófagos en hipoxia pueden inducir en las células T señales específicas del TCR, y la secreción de IL-2 e IFN- γ , pero no otras que son bloqueadas por la hipoxia, la proliferación de las células T, es de gran interés. Esta activación parcial, podría estar sugiriendo un posible defecto en la expresión del receptor de la IL-2 (CD25). No obstante, no observamos tal defecto en la expresión de CD25 en la membrana de las células T. Otra posibilidad que podría explicar la ausencia de proliferación, es que el contacto con macrófagos en hipoxia estuviese generando células T reguladoras (Jarnicki, 2006 # 304; Nordstrom, 2005 # 322; Xystrakis, 2004 # 1699), en este sentido, tampoco hemos detectado la expresión de Foxp3, en las células T con expresión alta de CD25.

En conjunto, nuestros resultados muestran que la regulación de moléculas co-estimuladoras, así como la inducción de citoquinas por los macrófagos cultivados a

bajas tensiones de oxígeno, pueden ser responsables de la formación de sinapsis inmunitarias eficaces para la producción de IFN- γ e IL-2 por las células T, que correlaciona con la inducción de la conformación activa del complejo TCR/CD3 ϵ , así como la fosforilación en tirosinas de la cadena ζ del TCR/CD3, y la tirosina 195 de LAT. Esto nos indica, que la bajada en las tensiones de oxígeno, como consecuencia de un proceso inflamatorio, prepara a los macrófagos para responder eficazmente en la activación de la célula T, y que esta respuesta está mediada por HIF-1 α .

Las citoquinas son liberadas durante la inflamación y contribuyen a organizar las actividades de los macrófagos y neutrófilos, además contribuyen al reclutamiento de leucocitos, a aumentar la hematopoyesis e inducir la fiebre. El TNF- α es una de las primeras citoquinas liberadas por los macrófagos después de la infección y, junto con la IL-1 β , es muy importante para la activación de las células inmunes. Se ha descrito que tanto el TNF- α como la IL-1 β favorecen la actividad de HIF-1 α (Hellwig-Burgel *et al.*, 1999). En este sentido no está claro si otras citoquinas pueden inducir HIF-1 α .

Nuestros resultados muestran que la hipoxia en ausencia de cualquier otro estímulo, induce a los macrófagos a secretar citoquinas pro-inflamatorias, tales como IFN- γ e IL-12. En este sentido, anteriormente ya se había descrito que la hipoxia era capaz de modificar la expresión de algunas citoquinas. Scannell y col, observaron que monocitos cultivados a bajas tensiones de oxígeno secretaban TNF- α al medio de cultivo (Scannell *et al.*, 1993). También se ha descrito que en el endotelio vascular y en sinoviocitos se induce IL-8 en hipoxia, a través de la activación de la ruta PI3K/Akt, p38 MAPK (Kim *et al.*, 2006; Ahn *et al.*, 2008). Además, células mononucleares periféricas, cultivadas a bajas tensiones de oxígeno, inducen IL-6 cuando se estimulan con fitohematoglutina (PHA) (Naldini *et al.*, 1997). De igual modo, ratones tratados con LPS, inducen la secreción de citoquinas inflamatorias tales como TNF- α , IL-6, IL-12 e IL-1 α/β , pero esta inducción descende en ratones HIF-1 $\alpha^{-/-}$ en la línea mieloide tratados con LPS (Peyssonnaud *et al.*, 2007). Nuestros datos indican que HIF-1 α , es el responsable de la inducción del IFN- γ a tensiones bajas de oxígeno, ya que al bloquear la inducción de HIF-1 α por hipoxia, se anula la inducción de IFN- γ . Además los macrófagos extraídos de los ratones HIF-1 $\alpha^{-/-}$ en la línea mieloide, tampoco inducen IFN- γ . En conclusión, podemos decir que la hipoxia modifica el patrón de expresión de citoquinas, lo que da lugar a una respuesta inflamatoria.

Las células T o las células NK son las principales responsables de la secreción de IFN- γ , sin embargo, varios estudios han descrito el papel de los macrófagos y las células dendríticas como células productoras de IFN- γ , de una manera tanto autocrina como paracrina (Fultz *et al.*, 1993; Di Marzio *et al.*, 1994; Puddu *et al.*, 1997; Munder *et al.*, 1998; Frucht *et al.*, 2001; Schindler *et al.*, 2001; Murata *et al.*, 2002). Así mismo, la IL-12 en colaboración con la IL-18 inducen a los macrófagos a secretar IFN- γ (Munder *et al.*, 1998), pero también puede ocurrir que el IFN- γ induzca a los macrófagos a secretar más IFN- γ , así como IL-12.

Los resultados de la inducción de IFN- γ por hipoxia en macrófagos elicitados, descritos en este trabajo, fueron corroborados en varios modelos. Por un parte se usó la línea celular J774A.1, para descartar el posible efecto de los granulocitos persistentes, tras su depleción, en el exudado peritoneal de donde provienen los macrófagos elicitados (Ver materiales y métodos). Además, macrófagos residentes del peritoneo también indujeron IFN- γ en respuesta a hipoxia. Estos resultados fueron confirmados *in vivo* por el aumento de los niveles de RNA mensajero de IFN- γ de macrófagos, tanto residentes como elicitados, extraídos de ratones expuestos a bajas tensiones de oxígeno. Por último, estos macrófagos no inducían IFN- γ si se extraían de los ratones HIF-1 α flox LysCre, en los que se ha eliminado HIF-1 α , en la línea mieloide de manera específica.

Tanto el IFN- γ como la IL-12 pueden inducir cascadas de señalización que aumentan la capacidad bactericida después de la fagocitosis, además de la expresión de las moléculas de coestimulación y de presentación antigénica, así como la inducción de células T CD8 + a la diferenciación hacia CTL (Nguyen and Benveniste, 2000; Giroux *et al.*, 2003; Haring *et al.*, 2005; Doody *et al.*, 2007). Nuestros datos demuestran, con estudios de RNA de interferencia frente a IFN- γ , que en hipoxia el IFN- γ media el incremento de fagocitosis, tanto en la unión como en la internalización, así como el aumento de sinapsis inmunes productivas (Figura 33).

En el desarrollo de este trabajo hemos demostrado que el factor de transcripción inducible por hipoxia HIF-1 α desempeña un papel crítico en la activación de macrófagos. Experimentos realizados no sólo con RNA de interferencia frente a IFN- γ , sino también frente a HIF-1 α , muestran una clara reducción en el porcentaje de fagocitosis, en la eficiencia de presentación antigénica a células T, así como, una reducción en la inducción de IFN- γ observada en hipoxia.

Hemos descrito un nuevo mecanismo que involucra a HIF-1 α en la producción de IFN- γ por los macrófagos (Figura 33). La unión de HIF-1 α al promotor del gen de IFN- γ ocurre a través de una secuencia de respuesta a hipoxia (HRE) que se encuentra conservada entre las distintas especies. Además, hemos demostrado, que HIF-1 α se une *in vivo* a esta secuencia mediante ensayos de ChIP y mediante ensayos de luciferasa hemos comprobado que el promotor es transcripcionalmente activo y el HRE funcional ya que al mutar dicha secuencia se pierde la actividad transcripcional. En este sentido, se han descrito otras citoquinas que también contienen sitios HRE en sus promotores, como por ejemplo el TNF- α , IL-6, o IL-8 (Kim *et al.*, 2006; Peyssonnaud *et al.*, 2007), sin embargo, no se conoce si estos sitios son realmente funcionales en los casos del TNF- α , y de la IL-6.

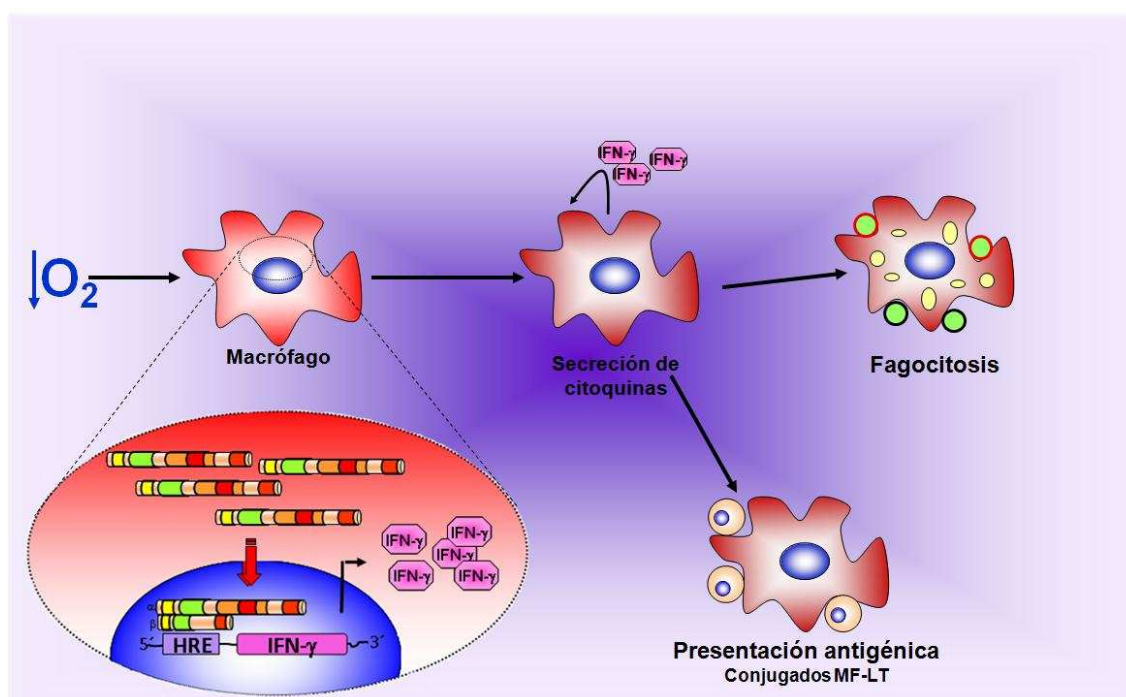


Figura 33. Modelo propuesto de la inducción de IFN- γ por HIF-1 α . HIF-1 α se une al HRE localizado en el promotor del gen del IFN- γ , induciendo la transcripción y secreción de IFN- γ , lo que favorece la activación de los macrófagos. Esta activación se traduce en un mayor porcentaje de fagocitosis y en un aumento en la capacidad presentadora y de formación de sinapsis inmunes productivas con células T.

Desde que HIF-1 α se une al promotor del IFN- γ (a tiempos cortos de la exposición a la hipoxia (6h) Figura 26), hasta que se produce la inducción del RNA mensajero (que no la detectamos hasta las 24 h (Figura 21A)), pasa un tiempo que induce a pensar que HIF-1 α necesita la ayuda de algún co-activador para iniciar la transcripción del

IFN- γ . En este sentido, se ha descrito que tanto AP-1 como STAT-4 regulan la transcripción de IFN- γ , y además, STAT-4 interactúa con HIF-1 α (Lawless *et al.*, 2000; Schindler *et al.*, 2001; Khomenko *et al.*, 2004), y AP-1 se activa por la hipoxia (Rupé and Baeuerle, 1995; Kunz and Ibrahim, 2003). Sin embargo, todavía no se sabe si existe alguna correlación entre STAT-4 y la hipoxia. Teniendo en cuenta esto, nuestros datos sugieren que la inducción de HIF-1 α , probablemente junto con otros factores de transcripción tipo STAT-4 y AP-1, pueden promover la activación transcripcional y secreción de citoquinas pro-inflamatorias como IFN- γ , IL-8, IL-6, TNF- α .

Los macrófagos se encuentran bajo el control de varios reguladores ambientales, que les induce a polarizarse hacia diferentes extremos. Tradicionalmente, la activación de los macrófagos se ha clasificado en dos grandes grupos (Figura 9): macrófagos tipo M1 o macrófagos pro-inflamatorios, que son macrófagos que se han activado por la vía clásica en la que intervienen el LPS, el IFN- γ o el TNF- α ; y macrófagos tipo M2 o macrófagos supresores de células inmunes, que son macrófagos que se han activado por la vía alternativa y en que interviene citoquinas tipo Th2, como la IL-4 o la IL-13.

Sin embargo, los macrófagos poseen una gran plasticidad, lo que les permite responder, con sutiles cambios fenotípicos y fisiológicos, a variaciones en las señales ambientales. Esta capacidad les permite participar tanto en la inmunidad innata como adaptativa. Actualmente se está empezando a clasificar los macrófagos, dependiendo de su función, en tres grandes grupos (Figura 34): a) Los macrófagos activados por la vía clásica (pro-inflamatorios); b) Los macrófagos reparadores; y c) Los macrófagos reguladores (anti-inflamatorios).

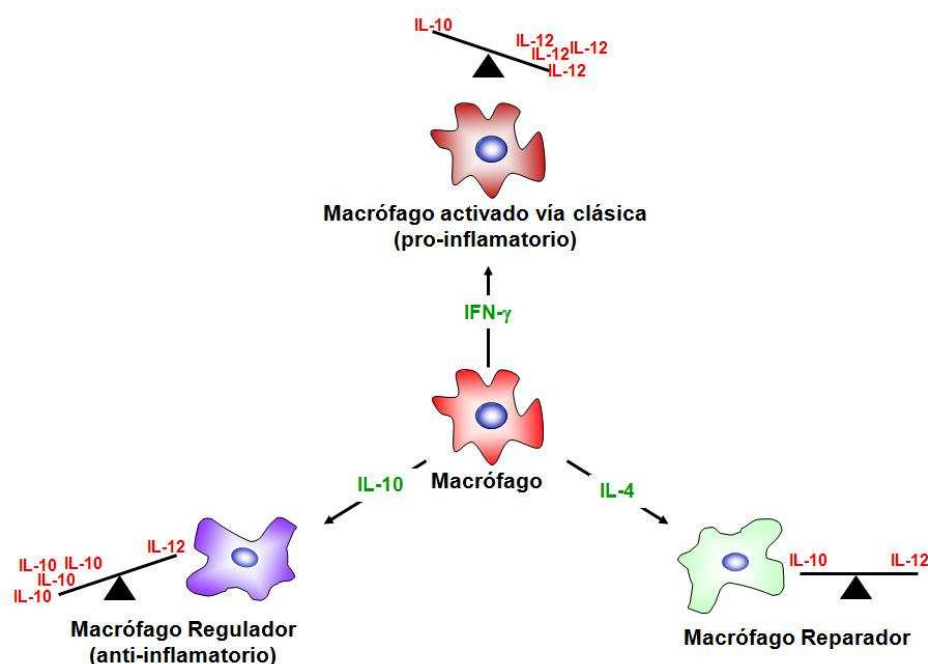


Figura 34. Plasticidad en la activación de los macrófagos. Los macrófagos activados por la vía clásica producen altos niveles de IL-12 y bajos de IL-10, mientras que los macrófagos reguladores producen altos niveles de IL-10 y bajos de IL-12. Sin embargo los macrófagos reparadores producen bajos niveles de ambas citoquinas.

En el transcurso de este trabajo hemos demostrado que la hipoxia estimula a los macrófagos a una activación similar a la producida por el LPS, es decir, a una activación pro-inflamatoria o clásica (M1) (Figura 35). De hecho, la activación clásica del macrófago desencadena la secreción de citoquinas pro-inflamatorias, lo que coincide con nuestros datos sobre la inducción de IFN- γ e IL-12, que junto con el aumento de IL-6, TNF- α , especies reactivas de oxígeno y la síntesis de NO que ya se había descrito previamente (Peyssonnaud *et al.*, 2005; Peyssonnaud *et al.*, 2007; Nishi *et al.*, 2008; Yoshida *et al.*, 2008). Además, con nuestros datos de que los macrófagos en hipoxia no inducen la IL-10, corroboran el fenotipo pro-inflamatorio que adquieren los macrófagos cultivados a bajas tensiones de oxígeno.

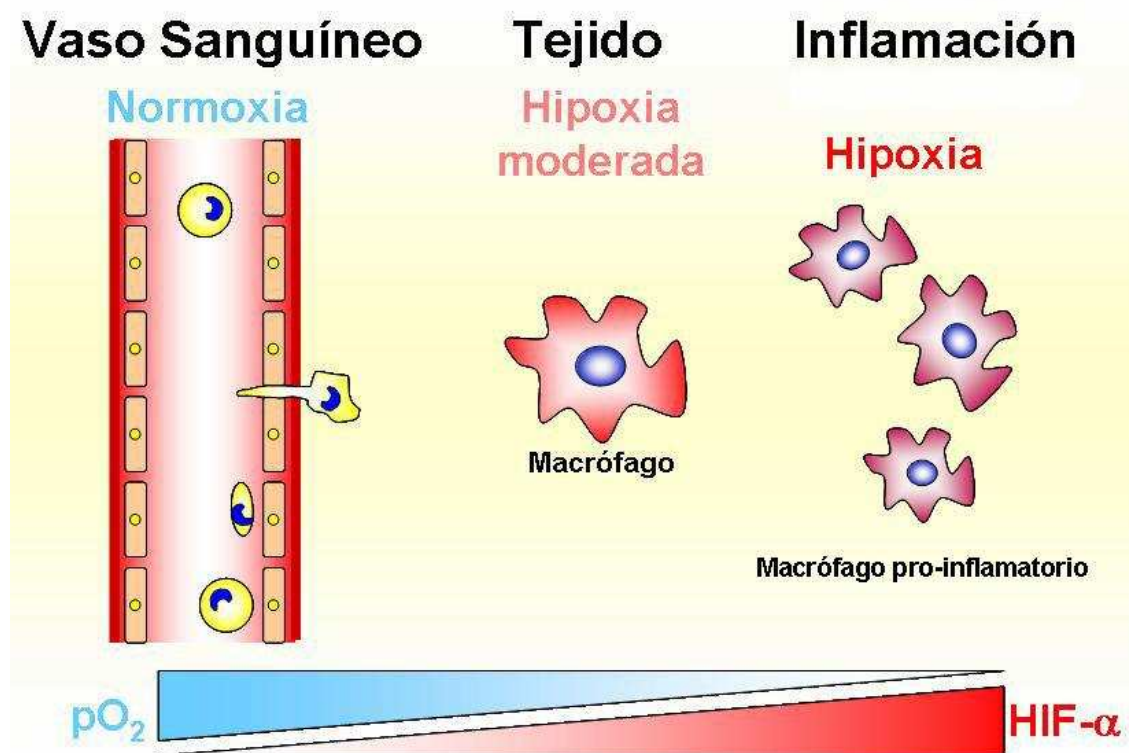


Figura 35. Modelo de activación por hipoxia.

Nuestros datos proporcionan evidencias que indican que únicamente por la bajada de las tensiones de oxígeno y en ausencia de cualquier otro estímulo, los macrófagos son capaces de potenciar sus funciones de presentación antigénica, fagocitosis, y la producción de citoquinas. Además, hemos propuesto un mecanismo de activación en el que HIF-1 α se une y activa el promotor de IFN- γ mediando así su producción, lo que contribuye a la obtención de un fenotipo de macrófagos activados. Esto nos sugiere que la bajada de las tensiones de oxígeno actúa como un paso previo que prepara a los macrófagos para desencadenar una respuesta activa (Figura 35). Esto es de vital importancia para comprender procesos inflamatorios que no se desencadenan por la infección de un patógeno, como por ejemplo en tumores, en aterosclerosis, en artritis reumatoide y en infartos de miocardio. Además de la hipoxia, el LPS u otras señales inflamatorias podrían actuar ya sea de manera sinérgica o antagónica para inducir o inhibir la activación de los macrófagos (Murata *et al.*, 2002; Mi *et al.*, 2008; Nishi *et al.*, 2008), en particular, en el desarrollo de la sepsis inducida por LPS (Peyssonnaud *et al.*, 2007), en la formación de placas de ateroma o la remodelación tisular. Sin embargo, son necesarios más estudios sobre estas respuestas para comprender la interacción entre las diferentes vías que participan en la modulación de la activación de los macrófagos.

CONCLUSIONES

La realización de este trabajo de Tesis, de acuerdo con los resultados previamente presentados, permite extraer las siguientes conclusiones:

1. La hipoxia induce la expresión de las moléculas coestimuladoras CD40, CD86, CD69 y MHC-I en macrófagos. Esto correlaciona con un aumento en la formación de sinapsis inmunológicas eficientes con las células T.
2. Los macrófagos cultivados en hipoxia, fagocitan de manera más eficiente que los cultivados en normoxia. Además, estos macrófagos inducen los receptores fagocíticos, CD11b, CD18 y FcγR.
3. La producción y secreción de las citoquinas inflamatorias, IFN-γ e IL-12, aumenta al cultivar los macrófagos a bajas tensiones de oxígeno, pero no así IL-10, lo que sugiere una polarización de los macrófagos hacia pro-inflamatorios (M1).
4. Los macrófagos cultivados en hipoxia producen un incremento en los niveles de IFN-γ. Este aumento es dependiente de HIF-1α ya que, ni los macrófagos interferidos con HIF-1α, ni los macrófagos extraídos de ratones HIF-1α^{flox} LysMCre, producen IFN-γ.
5. Hemos identificado el IFN-γ como nuevo gen diana de HIF-1α, localizando un elemento de respuesta a hipoxia (HRE) evolutivamente conservado y funcional, ya que HIF-1α se une *in vivo* en hipoxia y activa la transcripción *in vitro*.
6. Tanto el aumento en la fagocitosis como en la presentación antigénica, observados en hipoxia, son dependientes de la inducción del IFN-γ por HIF-1α, ya que al interferir tanto HIF-1α como el IFN-γ, estas funciones se reducen a los niveles basales de la normoxia.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, D.O., and Hamilton, T.A. (1987). Molecular transductional mechanisms by which IFN gamma and other signals regulate macrophage development. *Immunol Rev* 97, 5-27.
- Ahn, J.K., Koh, E.M., Cha, H.S., Lee, Y.S., Kim, J., Bae, E.K., and Ahn, K.S. (2008). Role of hypoxia-inducible factor-1alpha in hypoxia-induced expressions of IL-8, MMP-1 and MMP-3 in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *Rheumatology (Oxford)* 47, 834-839. .
- Albina, J.E., Mastrofrancesco, B., Vessella, J.A., Louis, C.A., Henry, W.L., Jr., and Reichner, J.S. (2001). HIF-1 expression in healing wounds: HIF-1alpha induction in primary inflammatory cells by TNF-alpha. *Am J Physiol Cell Physiol*. 281, C1971-1977.
- Alfranca, A., Gutierrez, M.D., Vara, A., Aragonés, J., Vidal, F., and Landazuri, M.O. (2002). c-Jun and hypoxia-inducible factor 1 functionally cooperate in hypoxia-induced gene transcription. *Mol Cell Biol* 22, 12-22.
- Altman, A., Isakov, N., and Baier, G. (2000). Protein kinase Ctheta: a new essential superstar on the T-cell stage. *Immunol Today* 21, 567-573.
- Alvarez-Tejado, M., Naranjo-Suarez, S., Jimenez, C., Carrera, A.C., Landazuri, M.O., and del Peso, L. (2001). Hypoxia induces the activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt cell survival pathway in PC12 cells: protective role in apoptosis. *J Biol Chem* 276, 22368-22374.
- Anand, R.J., Gribar, S.C., Li, J., Kohler, J.W., Branca, M.C., Dubowski, T., Sodhi, C.P., and Hackam, D.J. (2007). Hypoxia causes an increase in phagocytosis by macrophages in a HIF-1{alpha}-dependent manner. *J Leukoc Biol* 82, 1257-1265.
- Aragonés, J., Fraisl, P., Baes, M., and Carmeliet, P. (2009). Oxygen sensors at the crossroad of metabolism. *Cell Metab* 9, 11-22.
- Aragonés, J., Schneider, M., Van Geyte, K., Fraisl, P., Dresselaers, T., Mazzone, M., Dirx, R., Zacchigna, S., Lemieux, H., Jeoung, N.H., Lambrechts, D., Bishop, T., Lafuste, P., Diez-Juan, A., Harten, S.K., Van Noten, P., De Bock, K., Willam, C., Tjwa, M., Grosfeld, A., Navet, R., Moons, L., Vandendriessche, T., Deroose, C., Wijeyekoon, B., Nuyts, J., Jordan, B., Silasi-Mansat, R., Lupu, F., Dewerchin, M., Pugh, C., Salmon, P., Mortelmans, L., Gallez, B., Gorus, F., Buyse, J., Sluse, F., Harris, R.A., Gnaiger, E., Hespel, P., Van Hecke, P., Schuit, F., Van Veldhoven, P., Ratcliffe, P., Baes, M., Maxwell, P., and Carmeliet, P. (2008). Deficiency or inhibition of oxygen sensor Phd1 induces hypoxia tolerance by reprogramming basal metabolism. *Nat Genet*. 40, 170-180.
- Asikainen, T.M., Schneider, B.K., Waleh, N.S., Clyman, R.I., Ho, W.B., Flippin, L.A., Gunzler, V., and White, C.W. (2005). Activation of hypoxia-inducible factors in hyperoxia through prolyl 4-hydroxylase blockade in cells and explants of primate lung. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 10212-10217.
- Babior, B.M. (1984). The respiratory burst of phagocytes. *J Clin Invest* 73, 599-601.
- Babior, B.M. (2000). Phagocytes and oxidative stress. *Am J Med* 109, 33-44.
- Bergers, G., and Benjamin, L.E. (2003). Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer*. 3, 401-410.
- Berra, E., Benizri, E., Ginouves, A., Volmat, V., Roux, D., and Pouyssegur, J. (2003). HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1alpha in normoxia. *EMBO J* 22, 4082-4090.
- Berra, E., Ginouves, A., and Pouyssegur, J. (2006). The hypoxia-inducible-factor hydroxylases bring fresh air into hypoxia signalling. *EMBO Rep* 7, 41-45.
- Berra, E., Roux, D., Richard, D.E., and Pouyssegur, J. (2001). Hypoxia-inducible factor-1 alpha (HIF-1 alpha) escapes O(2)-driven proteasomal degradation irrespective of its subcellular localization: nucleus or cytoplasm. *EMBO Rep* 2, 615-620.
- Blanchard, N., Di Bartolo, V., and Hivroz, C. (2002). In the immune synapse, ZAP-70 controls T cell polarization and recruitment of signaling proteins but not formation of the synaptic pattern. *Immunity* 17, 389-399.

- Blouin, C.C., Page, E.L., Soucy, G.M., and Richard, D.E. (2004). Hypoxic gene activation by lipopolysaccharide in macrophages: implication of hypoxia-inducible factor 1 α . *Blood*. 103, 1124-1130.
- Boutin, A.T., Weidemann, A., Fu, Z., Mesropian, L., Gradin, K., Jamora, C., Wiesener, M., Eckardt, K.U., Koch, C.J., Ellies, L.G., Haddad, G., Haase, V.H., Simon, M.C., Poellinger, L., Powell, F.L., and Johnson, R.S. (2008). Epidermal sensing of oxygen is essential for systemic hypoxic response. *Cell*. 133, 223-234.
- Bruick, R.K. (2003). Oxygen sensing in the hypoxic response pathway: regulation of the hypoxia-inducible transcription factor. *Genes Dev* 17, 2614-2623.
- Bruick, R.K., and McKnight, S.L. (2001). A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science* 294, 1337-1340.
- Bunn, H.F., and Poyton, R.O. (1996). Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia. *Physiol Rev*. 76, 839-885.
- Burgdorf, S., Lukacs-Kornek, V., and Kurts, C. (2006). The mannose receptor mediates uptake of soluble but not of cell-associated antigen for cross-presentation. *J Immunol* 176, 6770-6776.
- Burke, B., Tang, N., Corke, K.P., Tazzyman, D., Ameri, K., Wells, M., and Lewis, C.E. (2002). Expression of HIF-1 α by human macrophages: implications for the use of macrophages in hypoxia-regulated cancer gene therapy. *J Pathol*. 196, 204-212.
- Celada, A., and Maki, R.A. (1992). Transforming growth factor-beta enhances the M-CSF and GM-CSF-stimulated proliferation of macrophages. *J Immunol* 148, 1102-1105.
- Celada, A., and Nathan, C. (1994). Macrophage activation revisited. *Immunol Today* 15, 100-102.
- Clausen, B.E., Burkhardt, C., Reith, W., Renkawitz, R., and Forster, I. (1999). Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice. *Transgenic Res*. 8, 265-277.
- Comalada, M., Cardo, M., Xaus, J., Valledor, A.F., Lloberas, J., Ventura, F., and Celada, A. (2003). Decorin reverses the repressive effect of autocrine-produced TGF-beta on mouse macrophage activation. *J Immunol* 170, 4450-4456.
- Compernelle, V., Brusselmans, K., Acker, T., Hoet, P., Tjwa, M., Beck, H., Plaisance, S., Dor, Y., Keshet, E., Lupu, F., Nemery, B., Dewerchin, M., Van Veldhoven, P., Plate, K., Moons, L., Collen, D., and Carmeliet, P. (2002). Loss of HIF-2 α and inhibition of VEGF impair fetal lung maturation, whereas treatment with VEGF prevents fatal respiratory distress in premature mice. *Nat Med* 8, 702-710.
- Conforti, L., and Millhorn, D.E. (1997). Selective inhibition of a slow-inactivating voltage-dependent K⁺ channel in rat PC12 cells by hypoxia. *J Physiol*. 502, 293-305.
- Conrad, P.W., Freeman, T.L., Beitner-Johnson, D., and Millhorn, D.E. (1999). EPAS1 trans-activation during hypoxia requires p42/p44 MAPK. *J Biol Chem* 274, 33709-33713.
- Conrad, P.W., Millhorn, D.E., and Beitner-Johnson, D. (2000). Hypoxia differentially regulates the mitogen- and stress-activated protein kinases. Role of Ca²⁺/CaM in the activation of MAPK and p38 gamma. *Adv Exp Med Biol* 475, 293-302.
- Crabtree, G.R. (1989). Contingent genetic regulatory events in T lymphocyte activation. *Science* 243, 355-361.
- Cramer, T., Yamanishi, Y., Clausen, B.E., Forster, I., Pawlinski, R., Mackman, N., Haase, V.H., Jaenisch, R., Corr, M., Nizet, V., Firestein, G.S., Gerber, H.P., Ferrara, N., and Johnson, R.S. (2003). HIF-1 α is essential for myeloid cell-mediated inflammation. *Cell* 112, 645-657.
- Czyzyk-Krzeska, M.F., Bayliss, D.A., Lawson, E.E., and Millhorn, D.E. (1992). Regulation of tyrosine hydroxylase gene expression in the rat carotid body by hypoxia. *J Neurochem*. 58, 1538-1546.
- Czyzyk-Krzeska, M.F., Furnari, B.A., Lawson, E.E., and Millhorn, D.E. (1994). Hypoxia increases rate of transcription and stability of tyrosine hydroxylase mRNA in pheochromocytoma (PC12) cells. *J Biol Chem*. 269, 760-764.

- Chandel, N.S., Budinger, G.R., Choe, S.H., and Schumacker, P.T. (1997). Cellular respiration during hypoxia. Role of cytochrome oxidase as the oxygen sensor in hepatocytes. *J Biol Chem* 272, 18808-18816.
- Chandel, N.S., Maltepe, E., Goldwasser, E., Mathieu, C.E., Simon, M.C., and Schumacker, P.T. (1998). Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 11715-11720.
- Chen, T.H., Wang, J.F., Chan, P., and Lee, H.M. (2005). Angiotensin II stimulates hypoxia-inducible factor 1alpha accumulation in glomerular mesangial cells. *Ann N Y Acad Sci* 1042, 286-293.
- Cheung, D.L., and Hamilton, J.A. (1992). Regulation of human monocyte DNA synthesis by colony-stimulating factors, cytokines, and cyclic adenosine monophosphate. *Blood* 79, 1972-1981.
- Chihab, R., Ferry, C., Koziel, V., Monin, P., and Daval, J.L. (1998). Sequential activation of activator protein-1-related transcription factors and JNK protein kinases may contribute to apoptotic death induced by transient hypoxia in developing brain neurons. *Brain Res Mol Brain Res* 63, 105-120.
- Chun, Y.S., Choi, E., Yeo, E.J., Lee, J.H., Kim, M.S., and Park, J.W. (2001). A new HIF-1 alpha variant induced by zinc ion suppresses HIF-1-mediated hypoxic responses. *J Cell Sci* 114, 4051-4061.
- Dagvadorj, J., Naiki, Y., Tumurkhuu, G., Hassan, F., Islam, S., Koide, N., Mori, I., Yoshida, T., and Yokochi, T. (2008). Interleukin-10 inhibits tumor necrosis factor-alpha production in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells through reduced MyD88 expression. *Innate Immun* 14, 109-115.
- de Gooyer, T.E., Stevenson, K.A., Humphries, P., Simpson, D.A., Curtis, T.M., Gardiner, T.A., and Stitt, A.W. (2006). Rod photoreceptor loss in Rho-/- mice reduces retinal hypoxia and hypoxia-regulated gene expression. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47, 5553-5560.
- del Peso, L., Castellanos, M.C., Temes, E., Martin-Puig, S., Cuevas, Y., Olmos, G., and Landazuri, M.O. (2003). The von Hippel Lindau/hypoxia-inducible factor (HIF) pathway regulates the transcription of the HIF-proline hydroxylase genes in response to low oxygen. *J Biol Chem* 278, 48690-48695.
- Di Marzio, P., Puddu, P., Conti, L., Belardelli, F., and Gessani, S. (1994). Interferon gamma upregulates its own gene expression in mouse peritoneal macrophages. *J Exp Med* 179, 1731-1736.
- Doody, G.M., Stephenson, S., McManamy, C., and Tooze, R.M. (2007). PRDM1/BLIMP-1 modulates IFN-gamma-dependent control of the MHC class I antigen-processing and peptide-loading pathway. *J Immunol* 179, 7614-7623.
- Du, G., Mouithys-Mickalad, A., and Sluse, F.E. (1998). Generation of superoxide anion by mitochondria and impairment of their functions during anoxia and reoxygenation in vitro. *Free Radic Biol Med* 25, 1066-1074.
- Dustin, M.L., and Cooper, J.A. (2000). The immunological synapse and the actin cytoskeleton: molecular hardware for T cell signaling. *Nat Immunol* 1, 23-29.
- Dustin, M.L., Olszowy, M.W., Holdorf, A.D., Li, J., Bromley, S., Desai, N., Widder, P., Rosenberger, F., van der Merwe, P.A., Allen, P.M., and Shaw, A.S. (1998). A novel adaptor protein orchestrates receptor patterning and cytoskeletal polarity in T-cell contacts. *Cell* 94, 667-677.
- Ema, M., Taya, S., Yokotani, N., Sogawa, K., Matsuda, Y., and Fujii-Kuriyama, Y. (1997). A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1alpha regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 4273-4278.
- Epstein, A.C., Gleadle, J.M., McNeill, L.A., Hewitson, K.S., O'Rourke, J., Mole, D.R., Mukherji, M., Metzen, E., Wilson, M.I., Dhanda, A., Tian, Y.M., Masson, N., Hamilton, D.L., Jaakkola, P., Barstead, R., Hodgkin, J., Maxwell, P.H., Pugh, C.W., Schofield, C.J., and Ratcliffe, P.J. (2001). C. elegans EGL-9 and mammalian

- homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell* 107, 43-54.
- Erecińska, M., and Silver, I.A. (2001). Tissue oxygen tension and brain sensitivity to hypoxia. *Respir Physiol* 128, 263-276.
- Erwig, L.P., and Henson, P.M. (2007). Immunological consequences of apoptotic cell phagocytosis. *Am J Pathol* 171, 2-8.
- Firth, J.D., Ebert, B.L., Pugh, C.W., and Ratcliffe, P.J. (1994). Oxygen-regulated control elements in the phosphoglycerate kinase 1 and lactate dehydrogenase A genes: similarities with the erythropoietin 3' enhancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 6496-6500.
- Firth, J.D., Ebert, B.L., and Ratcliffe, P.J. (1995). Hypoxic regulation of lactate dehydrogenase A. Interaction between hypoxia-inducible factor 1 and cAMP response elements. *J Biol Chem* 270, 21021-21027.
- Frantz, S., Vincent, K.A., Feron, O., and Kelly, R.A. (2005). Innate Immunity and Angiogenesis. *Circulation Research* January 7/21 96, 15-26.
- Frede, S., Stockmann, C., Freitag, P., and Fandrey, J. (2006). Bacterial lipopolysaccharide induces HIF-1 activation in human monocytes via p44/42 MAPK and NF-kappaB. *Biochem J* 396, 517-527.
- Frucht, D.M., Fukao, T., Bogdan, C., Schindler, H., O'Shea, J.J., and Koyasu, S. (2001). IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge. *Trends Immunol* 22, 556-560.
- Fultz, M.J., Barber, S.A., Dieffenbach, C.W., and Vogel, S.N. (1993). Induction of IFN-gamma in macrophages by lipopolysaccharide. *Int Immunol* 5, 1383-1392.
- Giroux, M., Schmidt, M., and Descoteaux, A. (2003). IFN-gamma-induced MHC class II expression: transactivation of class II transactivator promoter IV by IFN regulatory factor-1 is regulated by protein kinase C-alpha. *J Immunol* 171, 4187-4194.
- Gordon, S. (2003). Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 3, 23-35.
- Gorlach, A., Diebold, I., Schini-Kerth, V.B., Berchner-Pfannschmidt, U., Roth, U., Brandes, R.P., Kietzmann, T., and Busse, R. (2001). Thrombin activates the hypoxia-inducible factor-1 signaling pathway in vascular smooth muscle cells: Role of the p22(phox)-containing NADPH oxidase. *Circ Res* 89, 47-54.
- Gu, Y.Z., Moran, S.M., Hogenesch, J.B., Wartman, L., and Bradfield, C.A. (1998). Molecular characterization and chromosomal localization of a third alpha-class hypoxia inducible factor subunit, HIF3alpha. *Gene Expr* 7, 205-213.
- Hale, L.P., Braun, R.D., Gwinn, W.M., Greer, P.K., and Dewhirst, M.W. (2002). Hypoxia in the thymus: role of oxygen tension in thymocyte survival. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282, H1467-1477.
- Haring, J.S., Corbin, G.A., and Harty, J.T. (2005). Dynamic regulation of IFN-gamma signaling in antigen-specific CD8+ T cells responding to infection. *J Immunol* 174, 6791-6802.
- Heidbreder, M., Frohlich, F., Jöhren, O., Dendorfer, A., Qadri, F., and Dominiak, P. (2003). Hypoxia rapidly activates HIF-3alpha mRNA expression. *FASEB J* 17, 1541-1543.
- Hellwig-Burgel, T., Rutkowski, K., Metzen, E., Fandrey, J., and Jelkmann, W. (1999). Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1. *Blood* 94, 1561-1567.
- Hewitson, K.S., McNeill, L.A., Riordan, M.V., Tian, Y.M., Bullock, A.N., Welford, R.W., Elkins, J.M., Oldham, N.J., Bhattacharya, S., Gleadle, J.M., Ratcliffe, P.J., Pugh, C.W., and Schofield, C.J. (2002). Hypoxia-inducible factor (HIF) asparagine hydroxylase is identical to factor inhibiting HIF (FIH) and is related to the cupin structural family. *J Biol Chem* 277, 26351-26355.
- Hirsila, M., Koivunen, P., Gunzler, V., Kivirikko, K.I., and Myllyharju, J. (2003). Characterization of the human prolyl 4-hydroxylases that modify the hypoxia-inducible factor. *J Biol Chem* 278, 30772-30780.

- Hogquist, K.A., Jameson, S.C., Heath, W.R., Howard, J.L., Bevan, M.J., and Carbone, F.R. (1994). T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell* 76, 17-27.
- Hon, W.C., Wilson, M.I., Harlos, K., Claridge, T.D., Schofield, C.J., Pugh, C.W., Maxwell, P.H., Ratcliffe, P.J., Stuart, D.I., and Jones, E.Y. (2002). Structural basis for the recognition of hydroxyproline in HIF-1 alpha by pVHL. *Nature* 417, 975-978.
- Hsieh, C.S., Macatonia, S.E., Tripp, C.S., Wolf, S.F., O'Garra, A., and Murphy, K.M. (1993). Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science* 260, 547-549.
- Huang, L.E., Arany, Z., Livingston, D.M., and Bunn, H.F. (1996). Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit. *J Biol Chem* 271, 32253-32259.
- Huby, R.D., Carlile, G.W., and Ley, S.C. (1995). Interactions between the protein-tyrosine kinase ZAP-70, the proto-oncoprotein Vav, and tubulin in Jurkat T cells. *J Biol Chem* 270, 30241-30244.
- Imai, K., Takeshita, A., and Hanazawa, S. (2000). Transforming growth factor-beta inhibits lipopolysaccharide-stimulated expression of inflammatory cytokines in mouse macrophages through downregulation of activation protein 1 and CD14 receptor expression. *Infect Immun* 68, 2418-2423.
- Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., Kim, W., Valiando, J., Ohh, M., Salic, A., Asara, J.M., Lane, W.S., and Kaelin, W.G., Jr. (2001). HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O2 sensing. *Science* 292, 464-468.
- Jaakkola, P., Mole, D.R., Tian, Y.M., Wilson, M.I., Gielbert, J., Gaskell, S.J., Kriegsheim, A., Hebestreit, H.F., Mukherji, M., Schofield, C.J., Maxwell, P.H., Pugh, C.W., and Ratcliffe, P.J. (2001). Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O2-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 292, 468-472.
- Jackowski, S., Rettenmier, C.W., and Rock, C.O. (1990). Prostaglandin E2 inhibition of growth in a colony-stimulating factor 1-dependent macrophage cell line. *J Biol Chem* 265, 6611-6616.
- Jelkmann, W. (1992). Erythropoietin: structure, control of production, and function. *Physiol Rev* 72, 449-489.
- Jiang, B.H., Rue, E., Wang, G.L., Roe, R., and Semenza, G.L. (1996). Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 271, 17771-17778.
- Jung, Y.J., Isaacs, J.S., Lee, S., Trepel, J., and Neckers, L. (2003). IL-1beta-mediated up-regulation of HIF-1alpha via an NFkappaB/COX-2 pathway identifies HIF-1 as a critical link between inflammation and oncogenesis. *Faseb J* 17, 2115-2117.
- Kamura, T., Koepp, D.M., Conrad, M.N., Skowyra, D., Moreland, R.J., Iliopoulos, O., Lane, W.S., Kaelin, W.G., Jr., Elledge, S.J., Conaway, R.C., Harper, J.W., and Conaway, J.W. (1999). Rbx1, a component of the VHL tumor suppressor complex and SCF ubiquitin ligase. *Science* 284, 657-661.
- Ke, Q., and Costa, M. (2006). Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol* 70, 1469-1480.
- Khomenko, T., Deng, X., Sandor, Z., Tarnawski, A.S., and Szabo, S. (2004). Cysteamine alters redox state, HIF-1alpha transcriptional interactions and reduces duodenal mucosal oxygenation: novel insight into the mechanisms of duodenal ulceration. *Biochem Biophys Res Commun* 317, 121-127.
- Kim, K.S., Rajagopal, V., Gonsalves, C., Johnson, C., and Kalra, V.K. (2006). A novel role of hypoxia-inducible factor in cobalt chloride- and hypoxia-mediated expression of IL-8 chemokine in human endothelial cells. *J Immunol* 177, 7211-7224.
- Kindberg, G.M., Magnusson, S., Berg, T., and Smedsrod, B. (1990). Receptor-mediated endocytosis of ovalbumin by two carbohydrate-specific receptors in rat liver cells. The intracellular transport of ovalbumin to lysosomes is faster in liver endothelial cells than in parenchymal cells. *Biochem J* 270, 197-203.

- Koivunen, P., Tiainen, P., Hyvarinen, J., Williams, K.E., Sormunen, R., Klaus, S.J., Kivirikko, K.I., and Myllyharju, J. (2007). An endoplasmic reticulum transmembrane prolyl 4-hydroxylase is induced by hypoxia and acts on hypoxia-inducible factor alpha. *J Biol Chem* 282, 30544-30552.
- Kotch, L.E., Iyer, N.V., Laughner, E., and Semenza, G.L. (1999). Defective vascularization of HIF-1alpha-null embryos is not associated with VEGF deficiency but with mesenchymal cell death. *Dev Biol* 209, 254-267.
- Kovacsovics-Bankowski, M., and Rock, K.L. (1994). Presentation of exogenous antigens by macrophages: analysis of major histocompatibility complex class I and II presentation and regulation by cytokines. *Eur J Immunol* 24, 2421-2428.
- Kunz, M., and Ibrahim, S.M. (2003). Molecular responses to hypoxia in tumor cells. *Mol Cancer* 2, 23.
- Kupfer, H., Monks, C.R., and Kupfer, A. (1994). Small splenic B cells that bind to antigen-specific T helper (Th) cells and face the site of cytokine production in the Th cells selectively proliferate: immunofluorescence microscopic studies of Th-B antigen-presenting cell interactions. *J Exp Med* 179, 1507-1515.
- Laderoute, K.R., Mendonca, H.L., Calaoagan, J.M., Knapp, A.M., Giaccia, A.J., and Stork, P.J. (1999). Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (MKP-1) expression is induced by low oxygen conditions found in solid tumor microenvironments. A candidate MKP for the inactivation of hypoxia-inducible stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal protein kinase activity. *J Biol Chem* 274, 12890-12897.
- Lan, W., Harmon, D., Wang, J.H., Shorten, G., and Redmond, P. (2004). The effect of lidocaine on neutrophil CD11b/CD18 and endothelial ICAM-1 expression and IL-1beta concentrations induced by hypoxia-reoxygenation. *Eur J Anaesthesiol* 21, 967-972.
- Landazuri, M.O., Vara-Vega, A., Viton, M., Cuevas, Y., and del Peso, L. (2006). Analysis of HIF-prolyl hydroxylases binding to substrates. *Biochem Biophys Res Commun* 351, 313-320.
- Lando, D., Peet, D.J., Gorman, J.J., Whelan, D.A., Whitelaw, M.L., and Bruick, R.K. (2002a). FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev* 16, 1466-1471.
- Lando, D., Peet, D.J., Whelan, D.A., Gorman, J.J., and Whitelaw, M.L. (2002b). Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science* 295, 858-861.
- Lawless, V.A., Zhang, S., Ozes, O.N., Bruns, H.A., Oldham, I., Hoey, T., Grusby, M.J., and Kaplan, M.H. (2000). Stat4 regulates multiple components of IFN-gamma-inducing signaling pathways. *J Immunol* 165, 6803-6808.
- Le Page, C., Genin, P., Baines, M.G., and Hiscott, J. (2000). Interferon activation and innate immunity. *Rev Immunogenet* 2, 374-386.
- Lee, J.W., Bae, S.H., Jeong, J.W., Kim, S.H., and Kim, K.W. (2004). Hypoxia-inducible factor (HIF-1)alpha: its protein stability and biological functions. *Exp Mol Med* 36, 1-12.
- Lenschow, D.J., Herold, K.C., Rhee, L., Patel, B., Koons, A., Qin, H.Y., Fuchs, E., Singh, B., Thompson, C.B., and Bluestone, J.A. (1996). CD28/B7 regulation of Th1 and Th2 subsets in the development of autoimmune diabetes. *Immunity* 5, 285-293.
- Lewis, C., and Murdoch, C. (2005). Macrophage responses to hypoxia: implications for tumor progression and anti-cancer therapies. *Am J Pathol* 167, 627-635.
- Lewis, J.S., Lee, J.A., Underwood, J.C., Harris, A.L., and Lewis, C.E. (1999). Macrophage responses to hypoxia: relevance to disease mechanisms. *J Leukoc Biol* 66, 889-900.
- Lopez-Barneo, J., Ortega-Saenz, P., Molina, A., Franco-Obregon, A., Urena, J., and Castellano, A. (1997). Oxygen sensing by ion channels. *Kidney Int* 51, 454-461.

- Lopez-Barneo, J., Pardal, R., Montoro, R.J., Smani, T., Garcia-Hirschfeld, J., and Urena, J. (1999). K⁺ and Ca²⁺ channel activity and cytosolic [Ca²⁺] in oxygen-sensing tissues. *Respir Physiol* 115, 215-227.
- Lowin-Kropf, B., Shapiro, V.S., and Weiss, A. (1998). Cytoskeletal polarization of T cells is regulated by an immunoreceptor tyrosine-based activation motif-dependent mechanism. *J Cell Biol* 140, 861-871.
- Lukashev, D., Klebanov, B., Kojima, H., Grinberg, A., Ohta, A., Berenfeld, L., Wenger, R.H., and Sitkovsky, M. (2006). Cutting edge: hypoxia-inducible factor 1alpha and its activation-inducible short isoform I.1 negatively regulate functions of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes. *J Immunol* 177, 4962-4965.
- Mace, K.A., Yu, D.H., Paydar, K.Z., Boudreau, N., and Young, D.M. (2007). Sustained expression of Hif-1alpha in the diabetic environment promotes angiogenesis and cutaneous wound repair. *Wound Repair Regen*. 15, 636-645.
- Mahon, P.C., Hirota, K., and Semenza, G.L. (2001). FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1alpha and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes Dev* 15, 2675-2686.
- Makino, Y., Cao, R., Svensson, K., Bertilsson, G., Asman, M., Tanaka, H., Cao, Y., Berkenstam, A., and Poellinger, L. (2001). Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression. *Nature* 414, 550-554.
- Makino, Y., Kanopka, A., Wilson, W.J., Tanaka, H., and Poellinger, L. (2002). Inhibitory PAS domain protein (IPAS) is a hypoxia-inducible splicing variant of the hypoxia-inducible factor-3alpha locus. *J Biol Chem* 277, 32405-32408.
- Marie-Cardine, A., Kirchgessner, H., Eckerskorn, C., Meuer, S.C., and Schraven, B. (1995). Human T lymphocyte activation induces tyrosine phosphorylation of alpha-tubulin and its association with the SH2 domain of the p59fyn protein tyrosine kinase. *Eur J Immunol* 25, 3290-3297.
- Martin-Cofreces, N.B., Sancho, D., Fernandez, E., Vicente-Manzanares, M., Gordon-Alonso, M., Montoya, M.C., Michel, F., Acuto, O., Alarcon, B., and Sanchez-Madrid, F. (2006). Role of Fyn in the rearrangement of tubulin cytoskeleton induced through TCR. *J Immunol* 176, 4201-4207.
- Masson, N., Willam, C., Maxwell, P.H., Pugh, C.W., and Ratcliffe, P.J. (2001). Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor-alpha chains activated by prolyl hydroxylation. *EMBO J* 20, 5197-5206.
- Maxwell, P.H., Pugh, C.W., and Ratcliffe, P.J. (2001). The pVHL-hIF-1 system. A key mediator of oxygen homeostasis. *Adv Exp Med Biol*. 502, 365-376.
- Metzen, E., Berchner-Pfannschmidt, U., Stengel, P., Marxsen, J.H., Stolze, I., Klinger, M., Huang, W.Q., Wotzlaw, C., Hellwig-Burgel, T., Jelkmann, W., Acker, H., and Fandrey, J. (2003). Intracellular localisation of human HIF-1 alpha hydroxylases: implications for oxygen sensing. *J Cell Sci* 116, 1319-1326.
- Mi, Z., Rapisarda, A., Taylor, L., Brooks, A., Creighton-Gutteridge, M., Melillo, G., and Varesio, L. (2008). Synergistic induction of HIF-1alpha transcriptional activity by hypoxia and lipopolysaccharide in macrophages. *Cell Cycle* 7, 232-241.
- Milkiewicz, M., Pugh, C.W., and Egginton, S. (2004). Inhibition of endogenous HIF inactivation induces angiogenesis in ischaemic skeletal muscles of mice. *J Physiol*. 560, 21-26.
- Min, J.H., Yang, H., Ivan, M., Gertler, F., Kaelin, W.G., Jr., and Pavletich, N.P. (2002). Structure of an HIF-1alpha -pVHL complex: hydroxyproline recognition in signaling. *Science* 296, 1886-1889.
- Minamishima, Y.A., Moslehi, J., Bardeesy, N., Cullen, D., Bronson, R.T., and Kaelin, W.G., Jr. (2008). Somatic inactivation of the PHD2 prolyl hydroxylase causes polycythemia and congestive heart failure. *Blood* 111, 3236-3244.
- Minet, E., Arnould, T., Michel, G., Roland, I., Mottet, D., Raes, M., Remacle, J., and Michiels, C. (2000). ERK activation upon hypoxia: involvement in HIF-1 activation. *FEBS Lett* 468, 53-58.

- Monks, C.R., Freiberg, B.A., Kupfer, H., Sciaky, N., and Kupfer, A. (1998). Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature* 395, 82-86.
- Mosser, D.M., and Edwards, J.P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 8, 958-969.
- Muller, J.M., Krauss, B., Kaltschmidt, C., Baeuerle, P.A., and Rupec, R.A. (1997). Hypoxia induces c-fos transcription via a mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *J Biol Chem* 272, 23435-23439.
- Munder, M., Mallo, M., Eichmann, K., and Modolell, M. (1998). Murine macrophages secrete interferon gamma upon combined stimulation with interleukin (IL)-12 and IL-18: A novel pathway of autocrine macrophage activation. *J Exp Med.* 187, 2103-2108.
- Murata, Y., Ohteki, T., Koyasu, S., and Hamuro, J. (2002). IFN-gamma and pro-inflammatory cytokine production by antigen-presenting cells is dictated by intracellular thiol redox status regulated by oxygen tension. *Eur J Immunol.* 32, 2866-2873.
- Murdoch, C., Muthana, M., and Lewis, C.E. (2005). Hypoxia regulates macrophage functions in inflammation. *J Immunol.* 175, 6257-6263.
- Nair, S., Buiting, A.M., Rouse, R.J., Van Rooijen, N., Huang, L., and Rouse, B.T. (1995). Role of macrophages and dendritic cells in primary cytotoxic T lymphocyte responses. *Int Immunol* 7, 679-688.
- Nakayama, K., Frew, I.J., Hagensen, M., Skals, M., Habelhah, H., Bhoomik, A., Kadoya, T., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Frappell, P.B., Bowtell, D.D., and Ronai, Z. (2004). Siah2 regulates stability of prolyl-hydroxylases, controls HIF1alpha abundance, and modulates physiological responses to hypoxia. *Cell* 117, 941-952.
- Nakayama, K., Gazdoui, S., Abraham, R., Pan, Z.Q., and Ronai, Z. (2007). Hypoxia-induced assembly of prolyl hydroxylase PHD3 into complexes: implications for its activity and susceptibility for degradation by the E3 ligase Siah2. *Biochem J* 401, 217-226.
- Naldini, A., Carraro, F., Silvestri, S., and Bocci, V. (1997). Hypoxia affects cytokine production and proliferative responses by human peripheral mononuclear cells. *J Cell Physiol* 173, 335-342.
- Nguyen, V.T., and Benveniste, E.N. (2000). Involvement of STAT-1 and ets family members in interferon-gamma induction of CD40 transcription in microglia/macrophages. *J Biol Chem* 275, 23674-23684.
- Nishi, K., Oda, T., Takabuchi, S., Oda, S., Fukuda, K., Adachi, T., Semenza, G.L., Shingu, K., and Hirota, K. (2008). LPS induces hypoxia-inducible factor 1 activation in macrophage-differentiated cells in a reactive oxygen species-dependent manner. *Antioxid Redox Signal* 10, 983-995.
- O'Farrell, A.M., Liu, Y., Moore, K.W., and Mui, A.L. (1998). IL-10 inhibits macrophage activation and proliferation by distinct signaling mechanisms: evidence for Stat3-dependent and -independent pathways. *EMBO J* 17, 1006-1018.
- Olazabal, I.M., Caron, E., May, R.C., Schilling, K., Knecht, D.A., and Machesky, L.M. (2002). Rho-kinase and myosin-II control phagocytic cup formation during CR, but not FcgammaR, phagocytosis. *Curr Biol.* 12, 1413-1418.
- Olazabal, I.M., Martin-Cofreces, N.B., Mittelbrunn, M., Martinez Del Hoyo, G., Alarcon, B., and Sanchez-Madrid, F. (2008). Activation Outcomes Induced in Naive CD8 T Cells by Macrophages Primed via "Phagocytic" and Non-"Phagocytic" Pathways. *Mol Biol Cell* 19, 701-710.
- Oved, K., Ziv, O., Jacob-Hirsch, J., Noy, R., Novak, H., Makler, O., Galit, D., Keren, S., Segal, D., Gefen-Dor, C., Amariglio, N., Rechavi, G., and Reiter, Y. (2007). A novel postpriming regulatory check point of effector/memory T cells dictated through antigen density threshold-dependent anergy. *J Immunol.* 178, 2307-2317.

- Page, E.L., Chan, D.A., Giaccia, A.J., Levine, M., and Richard, D.E. (2008). Hypoxia-inducible factor-1 α stabilization in nonhypoxic conditions: role of oxidation and intracellular ascorbate depletion. *Mol Biol Cell* 19, 86-94.
- Page, E.L., Robitaille, G.A., Pouyssegur, J., and Richard, D.E. (2002). Induction of hypoxia-inducible factor-1 α by transcriptional and translational mechanisms. *J Biol Chem* 277, 48403-48409.
- Parmar, K., Mauch, P., Vergilio, J.A., Sackstein, R., and Down, J.D. (2007). Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 5431-5436.
- Pescador, N. (2007). Identificación de elementos es CIS responsables de la regulación de la expresión génica mediada por el factor inducible por hipoxia HIF. Identificación de elementos es CIS responsables de la regulación de la expresión génica mediada por el factor inducible por hipoxia HIF, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid.
- Pescador, N., Cuevas, Y., Naranjo, S., Alcaide, M., Villar, D., Landazuri, M.O., and Del Peso, L. (2005). Identification of a functional hypoxia-responsive element that regulates the expression of the egl nine homologue 3 (egln3/phd3) gene. *Biochem J* 390, 189-197.
- Peyssonnaud, C., Cejudo-Martin, P., Doedens, A., Zinkernagel, A.S., Johnson, R.S., and Nizet, V. (2007). Cutting edge: Essential role of hypoxia inducible factor-1 α in development of lipopolysaccharide-induced sepsis. *J Immunol* 178, 7516-7519.
- Peyssonnaud, C., Datta, V., Cramer, T., Doedens, A., Theodorakis, E.A., Gallo, R.L., Hurtado-Ziola, N., Nizet, V., and Johnson, R.S. (2005). HIF-1 α expression regulates the bactericidal capacity of phagocytes. *J Clin Invest* 115, 1806-1815.
- Pfeifer, J.D., Wick, M.J., Roberts, R.L., Findlay, K., Normark, S.J., and Harding, C.V. (1993). Phagocytic processing of bacterial antigens for class I MHC presentation to T cells. *Nature* 361, 359-362.
- Pozzi, L.A., Maciaszek, J.W., and Rock, K.L. (2005). Both dendritic cells and macrophages can stimulate naive CD8 T cells in vivo to proliferate, develop effector function, and differentiate into memory cells. *J Immunol* 175, 2071-2081.
- Puddu, P., Fantuzzi, L., Borghi, P., Varano, B., Rainaldi, G., Guillemard, E., Malorni, W., Nicaise, P., Wolf, S.F., Belardelli, F., and Gessani, S. (1997). IL-12 induces IFN- γ expression and secretion in mouse peritoneal macrophages. *J Immunol* 159, 3490-3497.
- Pugh, C.W., O'Rourke, J.F., Nagao, M., Gleadle, J.M., and Ratcliffe, P.J. (1997). Activation of hypoxia-inducible factor-1; definition of regulatory domains within the α subunit. *J Biol Chem* 272, 11205-11214.
- Qian, D., Lin, H.Y., Wang, H.M., Zhang, X., Liu, D.L., Li, Q.L., and Zhu, C. (2004). Normoxic induction of the hypoxic-inducible factor-1 α by interleukin-1 β involves the extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway in normal human cytotrophoblast cells. *Biol Reprod* 70, 1822-1827.
- Rey, M., Sanchez-Madrid, F., and Valenzuela-Fernandez, A. (2007). The role of actomyosin and the microtubular network in both the immunological synapse and T cell activation. *Front Biosci* 12, 437-447.
- Richard, D.E., Berra, E., and Pouyssegur, J. (2000). Nonhypoxic pathway mediates the induction of hypoxia-inducible factor 1 α in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 275, 26765-26771.
- Risueno, R.M., Gil, D., Fernandez, E., Sanchez-Madrid, F., and Alarcon, B. (2005). Ligand-induced conformational change in the T-cell receptor associated with productive immune synapses. *Blood* 106, 601-608.
- Risueno, R.M., van Santen, H.M., and Alarcon, B. (2006). A conformational change senses the strength of T cell receptor-ligand interaction during thymic selection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 9625-9630.
- Robbins, J.R., Lee, S.M., Filipovich, A.H., Szigligeti, P., Neumeier, L., Petrovic, M., and Conforti, L. (2005). Hypoxia modulates early events in T cell receptor-mediated activation in human T lymphocytes via Kv1.3 channels. *J Physiol* 564, 131-143.

- Ruppec, R.A., and Baeuerle, P.A. (1995). The genomic response of tumor cells to hypoxia and reoxygenation. Differential activation of transcription factors AP-1 and NF-kappa B. *Eur J Biochem.* 234, 632-640.
- Rupp, J., Gieffers, J., Klinger, M., van Zandbergen, G., Wrase, R., Maass, M., Solbach, W., Deiwick, J., and Hellwig-Burgel, T. (2007). Chlamydia pneumoniae directly interferes with HIF-1alpha stabilization in human host cells. *Cell Microbiol.* 9, 2181-2191.
- Safran, M., and Kaelin, W.G., Jr. (2003). HIF hydroxylation and the mammalian oxygen-sensing pathway. *J Clin Invest* 111, 779-783.
- Sahuquillo, A.G., Roumier, A., Teixeira, E., Bragado, R., and Alarcon, B. (1998). T cell receptor (TCR) engagement in apoptosis-defective, but interleukin 2 (IL-2)-producing, T cells results in impaired ZAP70/CD3-zeta association. *J Exp Med* 187, 1179-1192.
- Sancho, D., Vicente-Manzanares, M., Mittelbrunn, M., Montoya, M.C., Gordon-Alonso, M., Serrador, J.M., and Sanchez-Madrid, F. (2002). Regulation of microtubule-organizing center orientation and actomyosin cytoskeleton rearrangement during immune interactions. *Immunol Rev* 189, 84-97.
- Scannell, G., Waxman, K., Kaml, G.J., Ioli, G., Gatanaga, T., Yamamoto, R., and Granger, G.A. (1993). Hypoxia induces a human macrophage cell line to release tumor necrosis factor-alpha and its soluble receptors in vitro. *J Surg Res* 54, 281-285.
- Scannell, G., Waxman, K., Vaziri, N.D., Zhang, J., Kaupke, C.J., Jalali, M., and Hect, C. (1995a). Effects of trauma on leukocyte intercellular adhesion molecule-1, CD11b, and CD18 expressions. *J Trauma* 39, 641-644.
- Scannell, G., Waxman, K., Vaziri, N.D., Zhang, J., Kaupke, C.J., Jalali, M., and Hecht, C.C. (1995b). Hypoxia-induced alterations of neutrophil membrane receptors. *J Surg Res.* 59, 141-145.
- Schindler, H., Lutz, M.B., Rollinghoff, M., and Bogdan, C. (2001). The production of IFN-gamma by IL-12/IL-18-activated macrophages requires STAT4 signaling and is inhibited by IL-4. *J Immunol.* 166, 3075-3082.
- Schipani, E., Ryan, H.E., Didrickson, S., Kobayashi, T., Knight, M., and Johnson, R.S. (2001). Hypoxia in cartilage: HIF-1alpha is essential for chondrocyte growth arrest and survival. *Genes Dev.* 15, 2865-2876.
- Segal, A.W., Geisow, M., Garcia, R., Harper, A., and Miller, R. (1981). The respiratory burst of phagocytic cells is associated with a rise in vacuolar pH. *Nature* 290, 406-409.
- Seko, Y., Takahashi, N., Tobe, K., Kadowaki, T., and Yazaki, Y. (1997). Hypoxia and hypoxia/reoxygenation activate p65PAK, p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK), and stress-activated protein kinase (SAPK) in cultured rat cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 239, 840-844.
- Semenza, G. (2002). Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Pharmacol* 64, 993-998.
- Semenza, G.L. (2000). Surviving ischemia: adaptive responses mediated by hypoxia-inducible factor 1. *J Clin Invest.* 106, 809-812.
- Semenza, G.L. (2001). HIF-1, O(2), and the 3 PHDs: how animal cells signal hypoxia to the nucleus. *Cell.* 107, 1-3.
- Semenza, G.L. (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 3, 721-732.
- Semenza, G.L., Jiang, B.H., Leung, S.W., Passantino, R., Concordet, J.P., Maire, P., and Giallongo, A. (1996). Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem.* 271, 32529-32537.
- Semenza, G.L., Nejfelt, M.K., Chi, S.M., and Antonarakis, S.E. (1991). Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 5680-5684.

- Seta, K.A., Spicer, Z., Yuan, Y., Lu, G., and Millhorn, D.E. (2002). Responding to hypoxia: lessons from a model cell line. *Sci STKE* 2002, RE11.
- Shi, Y.H., Bingle, L., Gong, L.H., Wang, Y.X., Corke, K.P., and Fang, W.G. (2007). Basic FGF augments hypoxia induced HIF-1-alpha expression and VEGF release in T47D breast cancer cells. *Pathology* 39, 396-400.
- Simms, H., and D'Amico, R. (1995). Regulation of polymorphonuclear neutrophil CD16 and CD11b/CD18 expression by matrix proteins during hypoxia is VLA-5, VLA-6 dependent. *J Immunol* 155, 4979-4990.
- Sitkovsky, M., and Lukashev, D. (2005). Regulation of immune cells by local-tissue oxygen tension: HIF1 alpha and adenosine receptors. *Nat Rev Immunol* 5, 712-721.
- Soilleux, E.J., Turley, H., Tian, Y.M., Pugh, C.W., Gatter, K.C., and Harris, A.L. (2005). Use of novel monoclonal antibodies to determine the expression and distribution of the hypoxia regulatory factors PHD-1, PHD-2, PHD-3 and FIH in normal and neoplastic human tissues. *Histopathology* 47, 602-610.
- Sowter, H.M., Ratcliffe, P.J., Watson, P., Greenberg, A.H., and Harris, A.L. (2001). HIF-1-dependent regulation of hypoxic induction of the cell death factors BNIP3 and NIX in human tumors. *Cancer Res* 61, 6669-6673.
- Spear, W., Chan, D., Coppens, I., Johnson, R.S., Giaccia, A., and Blader, I.J. (2006). The host cell transcription factor hypoxia-inducible factor 1 is required for *Toxoplasma gondii* growth and survival at physiological oxygen levels. *Cell Microbiol.* 8, 339-352.
- Srinivas, V., Leshchinsky, I., Sang, N., King, M.P., Minchenko, A., and Caro, J. (2001). Oxygen sensing and HIF-1 activation does not require an active mitochondrial respiratory chain electron-transfer pathway. *J Biol Chem* 276, 21995-21998.
- Sun, Z., Arendt, C.W., Ellmeier, W., Schaeffer, E.M., Sunshine, M.J., Gandhi, L., Annes, J., Petrzilka, D., Kupfer, A., Schwartzberg, P.L., and Littman, D.R. (2000). PKC-theta is required for TCR-induced NF-kappaB activation in mature but not immature T lymphocytes. *Nature* 404, 402-407.
- Szigligeti, P., Neumeier, L., Duke, E., Chougnet, C., Takimoto, K., Lee, S.M., Filipovich, A.H., and Conforti, L. (2006). Signalling during hypoxia in human T lymphocytes--critical role of the src protein tyrosine kinase p56Lck in the O2 sensitivity of Kv1.3 channels. *J Physiol.* 573, 357-370.
- Takahara, K., Yashima, Y., Omatsu, Y., Yoshida, H., Kimura, Y., Kang, Y.S., Steinman, R.M., Park, C.G., and Inaba, K. (2004). Functional comparison of the mouse DC-SIGN, SIGNR1, SIGNR3 and Langerin, C-type lectins. *Int Immunol* 16, 819-829.
- Takeda, K., Aguila, H.L., Parikh, N.S., Li, X., Lamothe, K., Duan, L.J., Takeda, H., Lee, F.S., and Fong, G.H. (2008). Regulation of adult erythropoiesis by prolyl hydroxylase domain proteins. *Blood* 111, 3229-3235.
- Takeda, K., Ho, V.C., Takeda, H., Duan, L.J., Nagy, A., and Fong, G.H. (2006). Placental but not heart defects are associated with elevated hypoxia-inducible factor alpha levels in mice lacking prolyl hydroxylase domain protein 2. *Mol Cell Biol* 26, 8336-8346.
- Talks, K.L., Turley, H., Gatter, K.C., Maxwell, P.H., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J., and Harris, A.L. (2000). The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *Am J Pathol* 157, 411-421.
- Thiel, M., Caldwell, C.C., Kreth, S., Kuboki, S., Chen, P., Smith, P., Ohta, A., Lentsch, A.B., Lukashev, D., and Sitkovsky, M.V. (2007). Targeted deletion of HIF-1alpha gene in T cells prevents their inhibition in hypoxic inflamed tissues and improves septic mice survival. *PLoS ONE* 2, e853.
- Vairo, G., Argyriou, S., Bordun, A.M., Whitty, G., and Hamilton, J.A. (1990). Inhibition of the signaling pathways for macrophage proliferation by cyclic AMP. Lack of effect on early responses to colony stimulating factor-1. *J Biol Chem* 265, 2692-2701.

- Valledor, A.F., Borrás, F.E., Cullell-Young, M., and Celada, A. (1998). Transcription factors that regulate monocyte/macrophage differentiation. *J Leukoc Biol* 63, 405-417.
- van der Merwe, P.A. (2002). Formation and function of the immunological synapse. *Curr Opin Immunol* 14, 293-298.
- van Oers, N.S., Killeen, N., and Weiss, A. (1996). Lck regulates the tyrosine phosphorylation of the T cell receptor subunits and ZAP-70 in murine thymocytes. *J Exp Med* 183, 1053-1062.
- Vaux, E.C., Metzen, E., Yeates, K.M., and Ratcliffe, P.J. (2001). Regulation of hypoxia-inducible factor is preserved in the absence of a functioning mitochondrial respiratory chain. *Blood* 98, 296-302.
- Villar, D., Vara-Vega, A., Landazuri, M.O., and Del Peso, L. (2007). Identification of a region on hypoxia-inducible-factor prolyl 4-hydroxylases that determines their specificity for the oxygen degradation domains. *Biochem J* 408, 231-240.
- Wang, G.L., Jiang, B.H., Rue, E.A., and Semenza, G.L. (1995). Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 5510-5514.
- Wang, V., Davis, D.A., Haque, M., Huang, L.E., and Yarchoan, R. (2005). Differential gene up-regulation by hypoxia-inducible factor-1alpha and hypoxia-inducible factor-2alpha in HEK293T cells. *Cancer Res* 65, 3299-3306.
- Wenger, R.H. (2000). Mammalian oxygen sensing, signalling and gene regulation. *J Exp Biol.* 203, 1253-1263.
- Wenger, R.H. (2002). Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *FASEB J* 16, 1151-1162.
- Werner, F., Jain, M.K., Feinberg, M.W., Sibinga, N.E., Pellacani, A., Wiesel, P., Chin, M.T., Topper, J.N., Perrella, M.A., and Lee, M.E. (2000). Transforming growth factor-beta 1 inhibition of macrophage activation is mediated via Smad3. *J Biol Chem* 275, 36653-36658.
- Wiesener, M.S., Jurgensen, J.S., Rosenberger, C., Scholze, C.K., Horstrup, J.H., Warnecke, C., Mandriota, S., Bechmann, I., Frei, U.A., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J., Bachmann, S., Maxwell, P.H., and Eckardt, K.U. (2003). Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2alpha in distinct cell populations of different organs. *Faseb J.* 17, 271-273.
- Xaus, J., Comalada, M., Valledor, A.F., Cardo, M., Herrero, C., Soler, C., Lloberas, J., and Celada, A. (2001). Molecular mechanisms involved in macrophage survival, proliferation, activation or apoptosis. *Immunobiology* 204, 543-550.
- Yin, T., Sandhu, G., Wolfgang, C.D., Burrier, A., Webb, R.L., Rigel, D.F., Hai, T., and Whelan, J. (1997). Tissue-specific pattern of stress kinase activation in ischemic/reperfused heart and kidney. *J Biol Chem* 272, 19943-19950.
- Yoshida, K., Kirito, K., Yongzhen, H., Ozawa, K., Kaushansky, K., and Komatsu, N. (2008). Thrombopoietin (TPO) regulates HIF-1alpha levels through generation of mitochondrial reactive oxygen species. *Int J Hematol* 88, 43-51.
- Zelzer, E., Levy, Y., Kahana, C., Shilo, B.Z., Rubinstein, M., and Cohen, B. (1998). Insulin induces transcription of target genes through the hypoxia-inducible factor HIF-1alpha/ARNT. *Embo J* 17, 5085-5094.
- Zhang, W., Sloan-Lancaster, J., Kitchen, J., Tribble, R.P., and Samelson, L.E. (1998). LAT: the ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation. *Cell* 92, 83-92.
- Zhou, J., Fandrey, J., Schumann, J., Tiegs, G., and Brune, B. (2003a). NO and TNF-alpha released from activated macrophages stabilize HIF-1alpha in resting tubular LLC-PK1 cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 284, C439-446.
- Zhou, J., Schmid, T., and Brune, B. (2003b). Tumor necrosis factor-alpha causes accumulation of a ubiquitinated form of hypoxia inducible factor-1alpha through a nuclear factor-kappaB-dependent pathway. *Mol Biol Cell* 14, 2216-2225.

Zinkernagel, A.S., Johnson, R.S., and Nizet, V. (2007). Hypoxia inducible factor (HIF) function in innate immunity and infection. *J Mol Med.* 85, 1339-1346.

ANEXO

Macrophage Oxygen Sensing Modulates Antigen Presentation and Phagocytic Functions Involving IFN- γ Production through the HIF-1 α Transcription Factor¹

Bárbara Acosta-Iborra,^{2*} Ainara Elorza,^{2*} Isabel M. Olazabal,^{2*} Noa B. Martín-Cofreces,^{*} Silvia Martín-Puig,^{*} Marta Miró,[†] María J. Calzada,^{*} Julián Aragonés,^{*} Francisco Sánchez-Madrid,^{*,‡} and Manuel O. Landázuri^{3*}

Low oxygen tension areas are found in inflamed or diseased tissues where hypoxic cells induce survival pathways by regulating the hypoxia-inducible transcription factor (HIF). Macrophages are essential regulators of inflammation and, therefore, we have analyzed their response to hypoxia. Murine peritoneal elicited macrophages cultured under hypoxia produced higher levels of IFN- γ and IL-12 mRNA and protein than those cultured under normoxia. A similar IFN- γ increment was obtained with in vivo models using macrophages from mice exposed to atmospheric hypoxia. Our studies showed that IFN- γ induction was mediated through HIF-1 α binding to its promoter on a new functional hypoxia response element. The requirement of HIF- α in the IFN- γ induction was confirmed in RAW264.7 cells, where HIF-1 α was knocked down, as well as in resident HIF-1 α null macrophages. Moreover, Ag presentation capacity was enhanced in hypoxia through the up-regulation of costimulatory and Ag-presenting receptor expression. Hypoxic macrophages generated productive immune synapses with CD8 T cells that were more efficient for activation of TCR/CD3 ϵ , CD3 ζ and linker for activation of T cell phosphorylation, and T cell cytokine production. In addition, hypoxic macrophages bound opsonized particles with a higher efficiency, increasing their phagocytic uptake, through the up-regulated expression of phagocytic receptors. These hypoxia-increased immune responses were markedly reduced in HIF-1 α - and in IFN- γ -silenced macrophages, indicating a link between HIF-1 α and IFN- γ in the functional responses of macrophages to hypoxia. Our data underscore an important role of hypoxia in the activation of macrophage cytokine production, Ag-presenting activity, and phagocytic activity due to an HIF-1 α -mediated increase in IFN- γ levels. *The Journal of Immunology*, 2009, 182: 3155–3164.

Inflamed and ischemic tissues contain areas of hypoxia or low oxygen tensions as a consequence of inadequate blood supply. The ability of cells to generate energy in a mitochondrial-dependent manner is compromised in a hypoxic environment, thus undergoing adaptation mechanisms of their metabolism for survival. This response is mediated through the hypoxia-inducible factors (HIF)⁴ (1, 2), which regulate the transcription of genes involved in different processes such as angiogenesis (vascular en-

dothelial growth factor (VEGF)) (3, 4), glycolysis (glucose transporter type-1 (Glut-1)) (5, 6), and HIF autoregulation (prolyl hydroxylases domains (PHDs)) (7). HIF is a basic helix-loop-helix transcription factor of the Per-ARNT-Sim superfamily composed of two subunits, namely, HIF- α and HIF- β (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator). The HIF complex is modulated in an oxygen-sensitive manner through the availability of HIF- α protein, which, in the presence of oxygen, is targeted for degradation through hydroxylation at specific prolyl residues by PHDs (8, 9). HIF- α is then recognized and ubiquitinated by the Von Hippel Lindau E3 ubiquitin ligase complex for its degradation by the proteasome (10). In contrast, at low oxygen tensions, PHD enzymes can no longer hydroxylate the HIF- α subunit, which is stabilized and freed to form an active transcription complex with HIF- β , and is able to migrate to the nucleus and to bind to hypoxic response elements (HREs) within the promoter of specific target genes.

Macrophages play an important role in the innate as well as the adaptive immune response through their specific functions of phagocytosis, Ag presentation, cytokine secretion, and tissue remodeling. As professional phagocytes, macrophages express a wide variety of receptors that participate in the phagocytic uptake of Ags, including those that recognize Ig Fc fragments (mainly Fc γ Rs), and complement activation products such as C3b (CR3, CR4, CRI) (11, 12). Upon activation, macrophages are induced to produce cytokines such as IL-12, IL-18, IFN- γ , TNF- α , and IL-1 β

*Servicio de Inmunología, Hospital Universitario de la Princesa, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid; [†]Gabinete Veterinario, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid; [‡]Departamento de Biología Vascular e Inflamación, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, Madrid, Spain

Received for publication May 28, 2008. Accepted for publication December 27, 2008.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ This work was supported by the Migration and Inflammation Network UAMAD04 and Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (to M.O.L.) and Red Temática de Enfermedades Cardiovasculares (RD06/0014/0031 to M.O.L., RD06/0014/0030 to F.S.-M., and fellowship for M.M.). B.A.-I. is an investigator from the Ministerio de Educación y Ciencia. A.E. is from the Ministerio de Salud y Consumo. I.M.O., M.J.C., and J.A. are investigators from the Ministerio de Ciencia y Tecnología Programa Ramón y Cajal.

² B.A.-I., A.E., and I.M.O. contributed equally to this work.

³ Address correspondence and reprint requests to Dr. Manuel O. Landázuri, Servicio de Inmunología, Hospital de la Princesa, Universidad Autónoma de Madrid, C/ Diego de León, 62, E-28006, Madrid, Spain. E-mail address: mortiz.hlpr@salud.madrid.org

⁴ Abbreviations used in this paper: HIF, hypoxia-inducible factor; PHD, prolyl hydroxylase domain; VEGF, vascular endothelial growth factor; IS, immune synapse; MTOC, microtubule-organizing center; HRE, hypoxia response element; LAT, linker for activation of T cells; MHC-I/II, MHC class I/II; RT, real time; siRNA, small interfering RNA; ChIP, chromatin immunoprecipitation; siSCR,

scrambled siRNA; OVAp, OVA peptide; Glut-1, glucose transporter type-1; DMOG, dimethylxalylglycine.

Copyright © 2009 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/09/\$2.00

(13–20). Through these cytokines macrophages drive an inflammatory response by increasing their phagocytic capability. Moreover, these cytokines promote macrophage Ag processing and presentation and the differentiation and activation of Th1 IFN- γ -secreting cells, CTL, and NK cells (21–23). The goal of Ag presentation is to amplify the signal through T cell cytokine production and clonal expansion. Ag-loaded presenting cells (macrophages, dendritic cells, B cells) form stable conjugates with specific T cells and promote the relocalization of Ag recognition receptors, cell adhesion, and signaling molecules to the contact site, forming what has been termed the immune synapse (IS) (24, 25). During the formation of the IS, the TCR is engaged and activated for the recruitment of different signaling molecules, such as ZAP70 or linker for activation of T cells (LAT), the F-actin cytoskeleton is recruited to the contact site for the stabilization and reorganization of the IS, and the microtubule-organizing center (MTOC) is reoriented, increasing the efficient secretion of killing granules and cytokines (25–28).

Previous studies have documented that macrophages are involved in a number of inflammatory diseases such as atherosclerotic plaques, myocardial infarcts, rheumatoid arthritis, wound healing, bacterial infections, and malignant tumors, in which areas of hypoxia are present (29, 30). In these areas, macrophages express HIF protein abundantly and respond rapidly to hypoxia (31, 32). Moreover, HIF-1 α is stabilized in macrophages activated by nonhypoxic stimulus, playing a role in the proper infiltration and activation of leukocytes during an inflammatory process and mediating the bactericidal capacity and the control of pathogen spreading during infection (31–34). In this work, we have studied the effect of hypoxia on macrophage functions in the absence of any other stimuli. We report herein that under hypoxia macrophages are able to form efficient IS with increased T cell cytokine production ability and enhanced phagocytic uptake. Furthermore, hypoxia increases macrophage IFN- γ secretion, which is dependent on HIF-1 α binding to its promoter on a functional HRE site.

Materials and Methods

Mice

All experiments were performed in 6- to 12-wk-old mice. Mice were housed and bred in the Animal Unit of the School of Medicine (Universidad Autónoma, Madrid, Spain) in a pathogen-free facility. C57BL/6 mice (H-2^b) were used for macrophage isolation. OT-I mice, an H-2K^b restricted anti-OVA TCR-transgenic mice under a C57BL/6 background, were used for T lymphocyte isolation (35). Mice with myeloid lineage-specific knockout of HIF-1 α (HIF-1 α flox-LysMCre) have been previously described (33). Experimental procedures were approved by the Committee for Research Ethics of the Universidad Autónoma de Madrid and conducted under the supervision of the Universidad Autónoma de Madrid Head of Animal Welfare and Health in accordance with Spanish and European guidelines.

Cell culture

Peritoneal thioglycolate-elicited macrophages depleted of granulocytes were isolated by adhesion to tissue culture plates and several washes. CD8⁺ T cells were isolated from spleen and lymph nodes and were depleted from other populations using the AutoMACS magnetic sorter. Mice macrophages and T cells were maintained in RPMI 1640 medium with GLUTAMAX-I (Invitrogen) and RAW264.7 and J774A.1 cells were grown in DMEM (Cambrex). Both media were supplemented with 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, and 2 or 10% FCS (Cambrex), respectively. Cells cultured in normoxia were incubated in the present or absence of 10 ng/ml LPS (Sigma-Aldrich) during 40 h. Dimethylsulfoxide (DMSO) was purchased from BIOMOL.

Hypoxic conditions

The cells were routinely cultured in 21% O₂ and 5% CO₂ (normoxic conditions). To expose the cells to hypoxia, they were placed in an in vivo 400 hypoxia Work Station (Ruskin Technology) that was infused with a mix-

Table I. Primer sequences

No.	Target	Direction	Sequence
1	28S	F	CAGTACGAATACAGACCG
2	28S	R	GGCAACAACACATCATCAG
3	HIF-1 α	F	GTTTACTAAAGGACAAGTCACC
4	HIF-1 α	R	TTCTGTTTGTGAAGGGAG
5	PHD3	F	GATGCTGAAGAAAGGGC
6	PHD3	R	CTGGCAAGAGAGTATCTG
7	VEGF	F	TGCCAAGTGGTCCAG
8	VEGF	R	GTGAGGTCTTGATCCG
9	IFN- γ	F	TGGCTCTGCAGGATTTTCATG
10	IFN- γ	R	TCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA
11	IL-12p40	F	CAGATGACATGGTGAAGACG
12	IL-12p40	R	GTTGTGGAAGAACTCTCTCTAGTA
13	IL-18	F	AATGGCTGCCATGTCA
14	IL-18	R	TCCGTATTTACTGCGGTTCG
15	IL-10	F	CCAGCCTTATCGGAAATG
16	IL-10	R	TGGCCTTGATAGACACC
17	BNIP-3	F	GGCGTCTGACAACTTCC
18	BNIP-3	R	ACCGCATTTACAGAACAAATTAAC
19	IFN- γ promoter	F	ctcgagCCTTGGGTGTGTGAGTGAA
20	IFN- γ promoter	R	aagcttAGGAGAAGCCAGAACTTCT
21	IFN- γ mut	F	CTTGTGAAATTAGCAATCCCAGGA
22	IFN- γ mut	R	TCCTCGGGATTGCTAATTTTCAACAG
23	IFN- γ ChIP	F	CTCATCGTCAGAGAGCCCAA
24	IFN- γ ChIP	R	AGGATCAGCTGATGTGTCTT

ture of 1% O₂, 5% CO₂, and 94% N₂ (S.E. Carbureros Metalicos). For in vivo assays, mice were injected, when needed, with thioglycolate for 4 days, then exposed either to 21% (N) or 13% for 1 h and then 7.5% oxygen levels (Hx) for 40 h before macrophage isolation. Macrophages were isolated by peritoneal lavage and by adhesion to tissue-cultured plates.

Macrophage cytokine secretion and activation markers

For cytokine synthesis and secretion analysis, IL-12 and IFN- γ were detected by quantitative PCR (oligonucleotides in Table I) and by ELISA with BD Biosciences Abs at different time points under hypoxia exposure. For assessment of surface molecule expression on macrophages, cells were processed 40 h after hypoxia exposure with a cell dissociation buffer (Life Technologies). Cells were stained for CD11b, CD32/16, MHC class I (H-2^b), and MHC-II (I-A, I-B) using FITC-labeled Abs and for CD18, CD40, CD86, and F4/80 using biotin-labeled Abs and with allophycocyanin-streptavidin (BD Biosciences).

Immunoprecipitation and Western blot

Cells were processed with Laemmli buffer, resolved on 10% SDS-polyacrylamide gels, and immunoblotted with monoclonal HIF-1 α (1/1000; R&D Systems), polyclonal PHD3 (1/2000; Bethyl Laboratories), or Glut-1 (Santa Cruz Biotechnology). For Ag presentation assays, macrophage and conjugates were processed for immunoprecipitations and Western blot as previously described (36) with the following Abs: monoclonal anti-CD3 ζ 448 (1/100) (37), monoclonal anti-phosphotyrosine 4G10 Ab (1 μ g/ml; Upstate Biotechnology), polyclonal anti-phospho-LAT Y191, and anti-total LAT (1 and 2 μ g/ml respectively; Upstate Biotechnology). Immunolabeling was detected by ECL (Amersham Pharmacia Biotech) and visualized with a digital luminescent image analyzer (FUJI Film LAS-1000 CH).

Quantitative real-time (RT)-PCR

Cells were harvested in 1 ml of Ultraspec reagent (Biotecx) and RNA was reverse-transcribed to cDNA (Improm-II reverse transcriptase; Promega). The PCR were performed with the LC FastStart DNA master SYBR Green I kit (Roche Applied Science) and in a Light Cycler system (Roche Applied Science). Data were analyzed with Light Cycler software version 3.5.28 (Idaho Technology). For each sample, the gene copy number was normalized to the amount of ribosomal mRNA 28S. Primers used in Table I.

Small interfering RNA (siRNA) transfection

RAW264.7 cells were transfected according to the Lipofectamine 2000 (Invitrogen) protocol with 50 pmol of siRNA. HIF-1 α siRNA (sc-44225) and control scrambled siRNA (sc-37007) were from Santa Cruz Biotechnology. Macrophage peritoneal cells were transfected following HiPerFect manufacturer instructions (Qiagen) with 5 nM siRNA: scrambled, HIF-1 α , or IFN- γ . Transfected cells were incubated at 37°C and 5% CO₂ under normoxic or hypoxic conditions for 40 h.

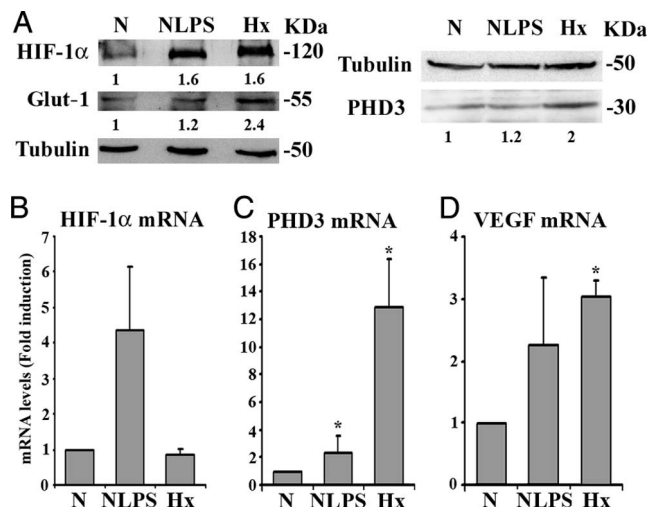


FIGURE 1. Expression of hypoxia-dependent genes in primary murine macrophages cultured in hypoxic conditions. *A*, Western blot analysis of HIF-1α, Glut-1, PHD3, and tubulin in macrophages cultured under normoxia (N), under normoxia with 10 ng/ml LPS (NLPS), or under 1% oxygen levels (hypoxia (Hx)) for 16 h. Densitometric analysis are represented as fold inductions compared with normoxia. Protein levels were normalized to tubulin. mRNA levels of HIF-1α (*B*), PHD3 (*C*), or VEGF (*D*) in macrophages treated as indicated in *A*.

Chromatin immunoprecipitation (ChIP)

For the ChIP assays, cells were exposed to hypoxia or normoxia for 6 h. Cells were processed as previously described (38). For immunoprecipitations, whole rabbit serum (IgG control) and polyclonal anti-HIF-1α anti-serum (ab2185; Abcam) were used. The PCR primers used are indicated in Table I.

Generation of plasmid construct

The IFN-γ promoter region was cloned using the mouse genomic sequence: -848 to -22 containing putative hypoxia-inducible regulatory sequences, which were amplified by PCR (primers in Table I). The PCR products were cloned into *Xho*I and *Hind*III sites of the pGL3 basic luciferase plasmid (Promega). Genomic DNA was used as a template for the PCRs. The mutant HRE was generated by PCR.

Cell nucleofection and reporter assays

RAW264.7 cells were nucleofected in normoxia following Amaxa nucleofection protocols and 3 h later were exposed or not to hypoxia. The luciferase reporter plasmids used were: *Renilla* firefly luciferase vector, pGL3-Luc, pGL3-PHD3-Luc (38), pGL3-IFN-γ-Luc and their mutated constructs at the HRE core: pGL3-PHD3Mut-Luc and pGL3-IFN-γMut-Luc. After 24 h of hypoxic exposure, cells were harvested and the firefly luciferase activity was quantified using a dual luciferase system (Promega) in which the firefly luciferase activity was normalized to the *Renilla* luciferase activity.

Ag presentation assays, immunofluorescence staining, and intracellular cytokine staining

Macrophages cultured under normoxic or hypoxic conditions for 40 h were loaded or not with 100 ng/ml (1 nM) OVA peptide (257–264, SIINFEKL) 2 h before T cell addition. Then, CD8⁺ T cells (1×10^6) were added in normoxia or hypoxia to macrophages during different time points depending on the assay. Immunofluorescence staining was performed using the monoclonal α-tubulin Ab FITC-labeled (Sigma-Aldrich) or the APA1/1 Ab, which detects the activated conformation of CD3 (39, 40). Intracellular cytokine T cell staining was performed as described previously by activation with PMA and ionomycin, inhibition of secretion with brefeldin A, and staining (41).

Opsonization and phagocytosis assays

Particles used were sheep RBC (SRBC) opsonized in normoxic conditions as previously described (42) for FcγR or CR-mediated phagocytosis using rabbit anti-SRBC IgG (MP Biomedicals) or IgM Abs (Accurate Chemical) and C5-deficient serum, respectively. Macrophages cultured under normoxic or hypoxic conditions for 40 h were starved for 2 h and were incubated with opsonized SRBC in a 1:20 ratio during 15 min. Cells were fixed and stained for Alexa Fluor 488-labeled anti-rabbit Abs (Molecular Probes) to detect the SRBC and with phalloidin labeled with Alexa Fluor 564 for F-actin staining. Internalized particles appeared big and swollen, while external particles appeared small and shrunken due to the fixation process.

Statistical analysis

Data were analyzed by the ANOVA Mann-Whitney *U* test followed by the Kruskal-Wallis test. The *p* values obtained are indicated in the text and figures.

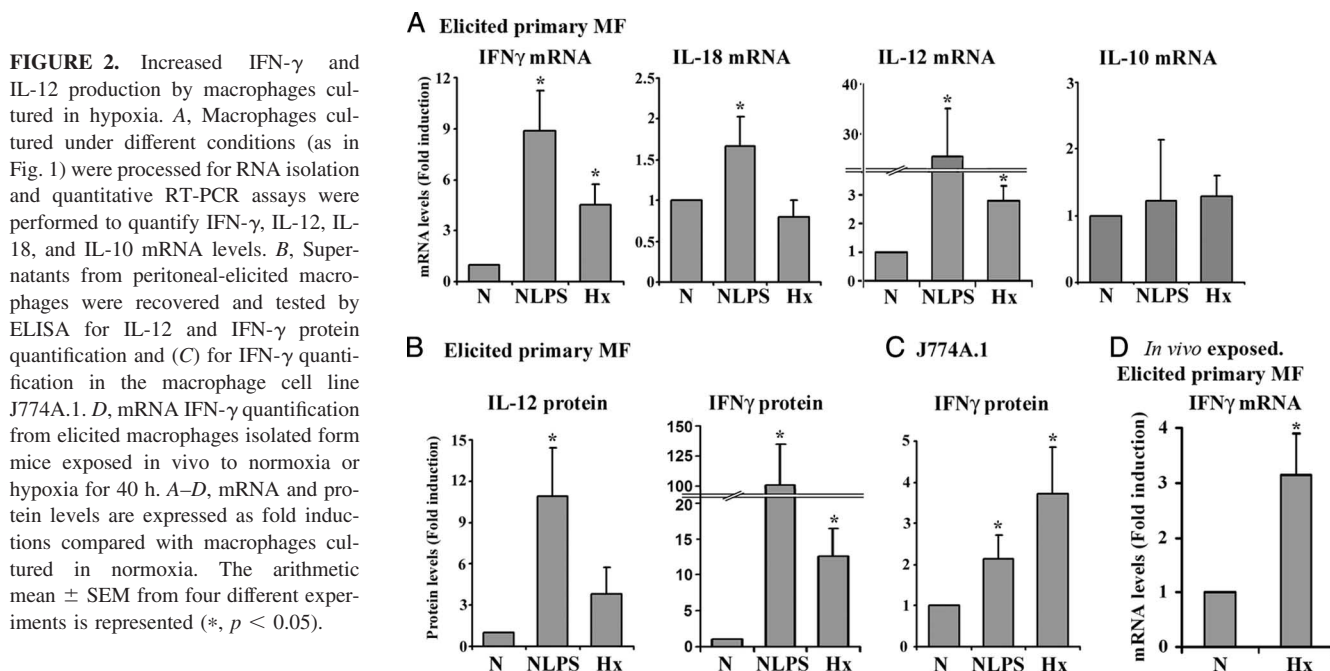


FIGURE 2. Increased IFN-γ and IL-12 production by macrophages cultured in hypoxia. *A*, Macrophages cultured under different conditions (as in Fig. 1) were processed for RNA isolation and quantitative RT-PCR assays were performed to quantify IFN-γ, IL-12, IL-18, and IL-10 mRNA levels. *B*, Supernatants from peritoneal-elicited macrophages were recovered and tested by ELISA for IL-12 and IFN-γ protein quantification and (*C*) for IFN-γ quantification in the macrophage cell line J774A.1. *D*, mRNA IFN-γ quantification from elicited macrophages isolated from mice exposed *in vivo* to normoxia or hypoxia for 40 h. *A–D*, mRNA and protein levels are expressed as fold inductions compared with macrophages cultured in normoxia. The arithmetic mean \pm SEM from four different experiments is represented (*, *p* < 0.05).

Results

Hypoxia induces macrophage proinflammatory cytokine production

Macrophages have been involved in inflammatory diseases where areas of hypoxia are present (29–32). Thus, we assessed whether hypoxia affected the cytokine production capacity in macrophages. We first characterized the response of macrophages to hypoxia by assessing the expression of several hypoxia-responsive genes (3–7) in peritoneal-elicited macrophages. HIF-1 α protein and the hypoxia-dependent proteins Glut-1 (5, 6) and PHD3 (7) were analyzed by Western blotting and were found to be increased under hypoxic conditions as compared with normoxia (Fig. 1A). These proteins were also induced, although at lower levels, in macrophages treated with LPS as a control of macrophage activation (Fig. 1A) (43, 44). HIF-2 α , another isoform of HIF- α (45), was undetected by Western blot and only detected at very low levels by quantitative RT-PCR (data not shown). HIF-1 α mRNA remained constant after hypoxia exposure (Fig. 1B). LPS-treated macrophages, however, expressed higher levels of HIF-1 α mRNA (43, 44). PHD3 and VEGF (3, 4) mRNA levels were induced both in macrophages under hypoxic conditions as well as in response to LPS (Fig. 1, C and D). These data indicate that primary macrophages respond to hypoxia by inducing hypoxia and HIF-1 α target-dependent genes.

Next, we analyzed whether hypoxia affected the inflammatory response of macrophages through RT-PCR and ELISA. Our results indicated that elicited macrophages under hypoxia significantly induced IFN- γ and IL-12, but not IL-18. However, LPS-treated macrophages induced these three cytokines (Fig. 2A). In contrast, the anti-inflammatory cytokine IL-10 mRNA was not induced either by hypoxia or LPS (Fig. 2A). IFN- γ protein secretion was assayed in peritoneal-elicited macrophages, and similar effects were observed in resident macrophages or the macrophage cell line J774A.1 (Fig. 2, B and C, and data not shown). To corroborate these data, RNA was extracted from macrophages from mice exposed *in vivo* to hypoxia, and IFN- γ mRNA was also induced compared with normoxic mice (Fig. 2D). These results indicate that hypoxia stimulates macrophages to secrete the proinflammatory cytokines IFN- γ and IL-12, while IL-10 anti-inflammatory cytokine levels remained constant, suggesting that the fine modulation of cytokines may be involved in an activatory phenotype of macrophages under an hypoxic environment.

HIF-1 α mediates IFN- γ production in hypoxia

To determine the involvement of the canonical hypoxia pathway in the proinflammatory response of macrophages, we used an inhibitor of PHDs, DMOG, that stabilizes HIF-1 α in normoxic conditions, resembling the HIF-1 α -mediated response to hypoxia (46, 47). Elicited peritoneal macrophages incubated with 100 μ M DMOG increased both mRNA and protein levels of IFN- γ at 48 h (Fig. 3A). The direct role of HIF-1 α in the induction of IFN- γ was also evidenced in macrophages transfected with HIF-1 α siRNA and cultured under hypoxia. A clear reduction was observed in HIF-1 α protein and a significant decrease in IFN- γ mRNA levels after interference, compared with macrophages transfected with scrambled siRNA (siSCR; $p < 0.05$) and to control (mock transfected) (Fig. 3, B and C). Moreover, resident peritoneal macrophages isolated from myeloid lineage-specific HIF-1 α knockout mice exposed to hypoxia did not induce the transcription of IFN- γ nor BNIP-3 (an HIF-1 α -dependent gene (48, 49)), compared with macrophages from the corresponding control mice (Fig. 3D). Taken together, these evidences confirmed that HIF-1 α plays an im-

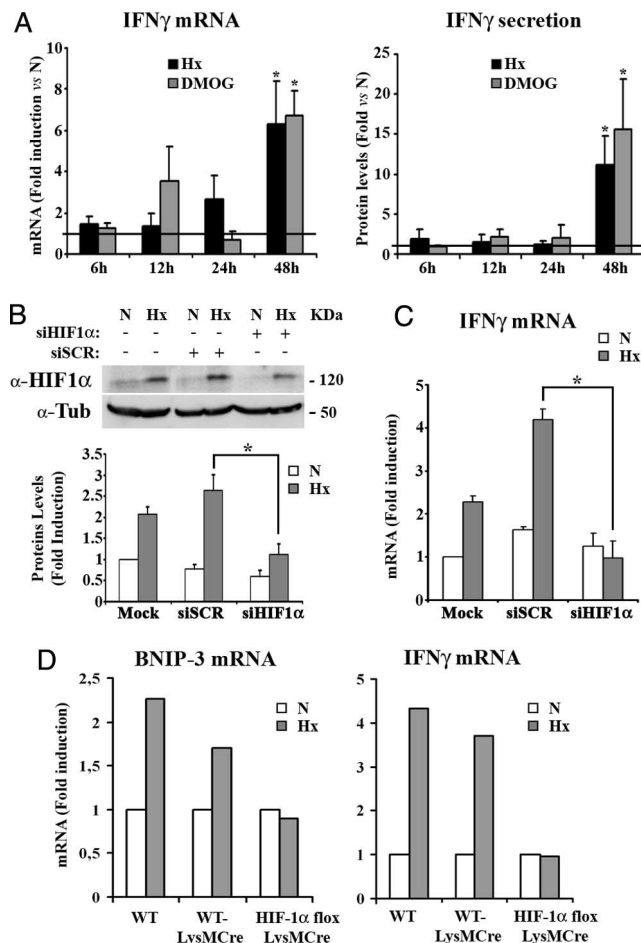


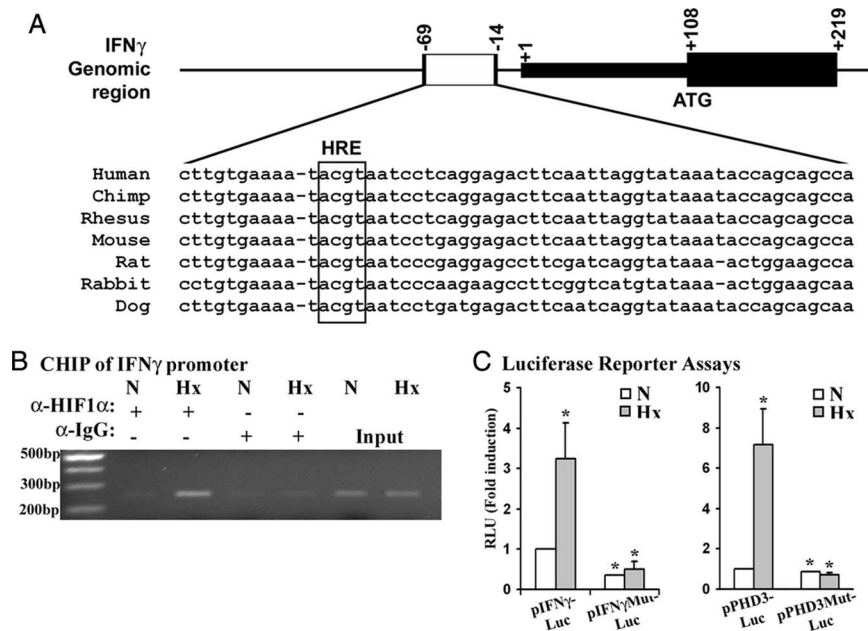
FIGURE 3. HIF-1 α mediates the IFN- γ production in hypoxia. **A**, Kinetics of mRNA and protein levels of IFN- γ in macrophages in normoxia in the presence or absence of 100 μ M DMOG or in hypoxia. Results are expressed as fold induction compared with normoxia (*, $p < 0.05$). **B** and **C**, RAW264.7 cells were either mock transfected or transfected with siRNA for HIF-1 α (siHIF1 α) or its scramble control (siSCR) and incubated under normoxia (N) or hypoxia (Hx). *Upper panel*, Representative Western blot analysis of HIF-1 α and tubulin as loading control. *Lower panel*, Densitometric analyses are represented as fold inductions compared with normoxia in mock-transfected cells and normalized by tubulin. **C**, IFN- γ mRNA levels are expressed as fold inductions compared with normoxia. **D**, Resident macrophages isolated from control mice (WT and WT-LysMCre) or HIF-1 α knockout mice (HIF-1 α flox-LysMCre) exposed *in vivo* to hypoxia. IFN- γ mRNA levels are expressed as fold inductions of hypoxia vs normoxia. Data correspond to macrophages pooled from three different animals for each experimental condition.

portant role in the hypoxia-mediated production of the IFN- γ cytokine.

Consequently, the search for HRE sites within the promoter of the IFN- γ gene rendered a putative HRE site conserved among different mammalian species (Fig. 4A). To ascertain whether this HRE site was a functional HIF binding site, the *in vivo* binding of HIF-1 α to the IFN- γ promoter was tested by HIF-1 α ChIP assay on elicited peritoneal macrophages cultured under normoxic or hypoxic conditions. Under hypoxic conditions, endogenous HIF-1 α protein bound to HRE within the IFN- γ promoter, whereas no binding was observed under normoxic conditions (Fig. 4B).

To assess the functionality of this HRE site, the -848 to -22 sequence from the murine IFN- γ promoter was cloned in a luciferase reporter expression vector. RAW 264.7 cells were nucleofected and cultured under normoxia or hypoxia for 16 h. The luciferase expression of this IFN- γ construct was induced under

FIGURE 4. HIF-1 α binds to a functional HRE site in the IFN- γ promoter. **A**, Blast sequence alignment of 1000 bp of the IFN- γ proximal promoter sequence of different mammalian species containing the conserved HRE site remarked by a box. **B**, ChIP of the DNA from primary macrophages cultured in normoxia (N) or hypoxia (Hx) during 6 h with either anti-HIF-1 α Ab (lanes 1 and 2) or anti-IgG Ab (lanes 3 and 4); total lysate (input, lanes 5 and 6). **C**, RAW264.7 macrophage cell line was nucleofected with constructs expressing the IFN- γ or PHD3 promoter containing the wild-type HRE site (pIFN- γ -Luc, pPHD3-Luc) or a mutated HRE site (pIFN- γ Mut-Luc or pPHD3Mut-Luc). Results are expressed as the fold induction of relative luciferase units (RLU).



hypoxic conditions (Fig. 4C) compared with normoxic macrophages. As a positive control, the PHD3 promoter construct responded efficiently to hypoxia (Fig. 4C). To confirm that the hypoxia program in macrophages involves the HRE site of the IFN- γ promoter, a mutant construct was generated in which the central conserved ACGT core was mutated to TAGC. A similar PHD3 mutant construct was also used as control (38). These mutant constructs were no longer responsive to hypoxia, either in the IFN- γ promoter or in the PHD3 promoter (Fig. 4C). Altogether, these results indicate that the activatory response of macrophages in hypoxia is directly mediated through HIF-1 α , which binds to the new, functional HRE site present in the IFN- γ promoter.

Hypoxia enhances macrophage expression of Ag-presenting molecules and the formation of productive IS

Since hypoxic macrophages induce proinflammatory cytokine production, we analyzed whether hypoxia affected elicited peritoneal macrophage functions such as Ag presentation. First, the expression of costimulatory and Ag presentation molecules was determined under hypoxic conditions. CD40, CD86, and MHC-I expression levels were enhanced in hypoxic macrophages compared with macrophages cultured in normoxia (Fig. 5A). In contrast, CD80 and MHC-II expression was not induced significantly (data not shown).

Next, the nature and characteristics of the IS were analyzed in macrophages cultured under hypoxic conditions. Since MHC-I expression was significantly up-regulated during hypoxia, we focused on MHC-I presentation. Thus, macrophages loaded with OVA peptide₂₅₇₋₂₆₄ (OVAp) were conjugated with CD8 $^{+}$ T cells from OT-I mice and the number of conjugates formed was determined. No significant differences were observed in the number of conjugates formed in normoxic and hypoxic macrophages (data not shown). T cell activation during IS requires the translocation of the MTOC for the efficient secretion of cytokines (50). Therefore, T cell MTOC translocation toward the contact area was analyzed, showing a high translocation efficiency (70% positive T cells) in normoxia that was only slightly increased in the T cells cultivated with hypoxia- and LPS-treated macrophages (data not shown).

Since the number of IS was not altered in response to hypoxia, we next determined whether hypoxia increased the efficiency of

these IS by analyzing the conformationally active CD3 ϵ chain, staining with the specific Ab APA 1/1 (39, 40). Hypoxic macrophages induced a much higher percentage of active TCR/CD3 ϵ conformation compared with normoxic macrophages (Fig. 5, B and C). To further confirm the effect of hypoxic macrophages on the TCR engagement regulation, different markers of the TCR proximal activation signals were analyzed. The phosphorylation of CD3 ζ and of its downstream T cell-specific protein LAT on Y195 residue was assessed. Western blot analyses revealed that in the presence of OVAp, hypoxic macrophages (Hx $^{+}$) induced stronger TCR/CD3 ζ and LAT phosphorylation signals, as well as LPS-treated macrophages (NLP $^{+}$) compared with normoxic macrophages (N $^{+}$; Fig. 5, D and E).

Next, we assessed later events of T cell activation such as cytokine production. T cells conjugated under hypoxia conditions with macrophages loaded with OVAp (Hx $^{+}$) showed increased IL-2 and IFN- γ production compared with T cells conjugated in normoxia (N $^{+}$; Fig. 5F). To discard a possible effect of hypoxia on this T cell activation, macrophages cultured under normoxia or hypoxia were fixed, loaded or not with OVAp, and subsequently incubated with T cells under normoxia. A similar result was obtained, indicating that OVAp-loaded hypoxic macrophages induce T cells (normoxic or hypoxic) to produce cytokines more efficiently (supplemental Fig. 1S⁵).

Taken together, these results indicate that macrophages under hypoxia induced productive IS, with increased active TCR/CD3 ϵ conformation, early signaling events, and proinflammatory cytokine production.

Hypoxia induces the phagocytic activity of macrophages

To further analyze the role of hypoxia on macrophage functions, macrophage phagocytosis assays were performed on elicited peritoneal macrophages. CR (CD11b (α_M)/CD18 (β_2))- and Fc γ R (CD32/CD16)-mediated phagocytosis were assessed as two different opsonic phagocytic pathways. Both the binding and the internalization of differently opsonized SRBC were increased in macrophages cultured in hypoxia compared with macrophages

⁵ The online version of this article contains supplemental material.

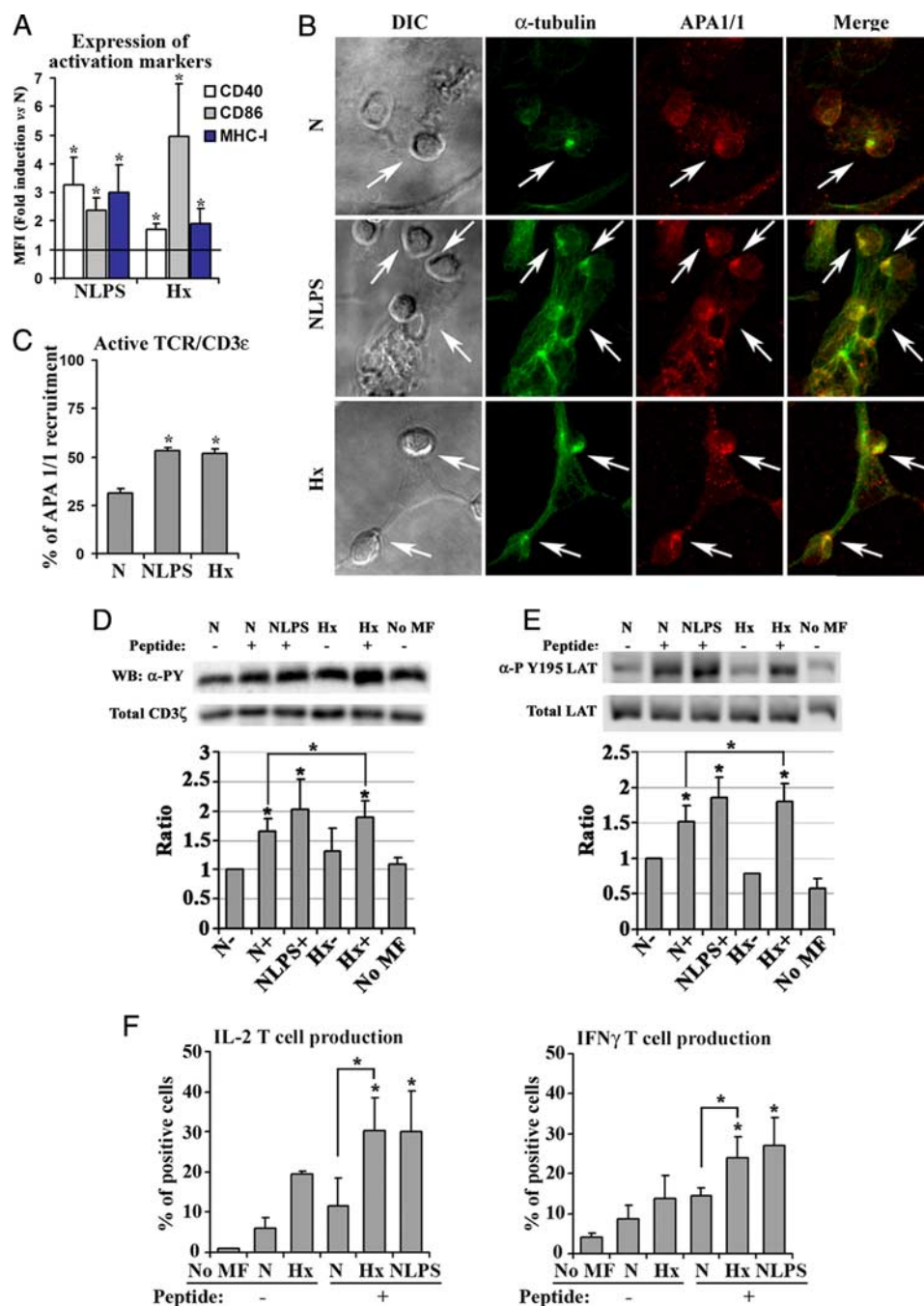


FIGURE 5. Macrophages form productive IS more efficiently in hypoxia. *A*, Cytometric analysis of CD40, CD86, and MHC-I, were performed in macrophages cultured in normoxia with or without LPS or in hypoxia. Results are expressed as the mean fluorescence intensity (MFI) normalized to normoxia expression and the mean of five different experiments is represented. *B*, Conjugates were formed during 20 min between the different cultured macrophages (as in Fig. 1) and CD8⁺ T cells in the presence of OVAp in normoxia or hypoxia. Conjugates were then fixed and stained: differential interference contrast (DIC; *left panel*), MTOC is detected with α -tubulin Ab (green), active TCR/CD3 ϵ conformation is detected with APA1/1 Ab (red), merged images (*right panel*). *C*, The number of T cells with active TCR/CD3 ϵ recruited to the contact site was quantified and expressed as the percentage of the conjugates formed. Results correspond to arithmetic mean \pm SEM of four independent experiments (*, $p < 0.01$). *D*, Macrophage/T cell conjugates were processed and immunoprecipitated with anti-CD3 ζ Ab and immunoblotted for anti-phosphotyrosine residues with 4G10 Ab (*upper panel*) or for total CD3 ζ (*lower panel*) or *E*, immunoblotted for Y195-phosphorylated LAT (*upper panel*) or total LAT (*lower panel*). T cells without macrophages are represented as No MF. Graphs below *D* and *E* show the results of densitometric analysis, presented as the ratio of phosphorylated to total protein bands. Data are the arithmetic means \pm SEM of four different experiments (*, $p < 0.05$). *F*, Macrophages were cultured under normoxia with or without LPS or under hypoxia for 40 h. Conjugates were then formed under the same oxygen conditions for 40 h with CD8⁺ T cells and in the presence or absence of 100 nM OVAp. T cells were analyzed for the intracellular production of IL-2 (*left*) and IFN- γ (*right*) by flow cytometry (see *Materials and Methods*). Data were quantified and expressed as the percentage of positive cells. The mean \pm SEM of four different experiments is represented (*, $p < 0.05$).

cultured in normoxia (2.5- to 3-fold and 1.5-fold for CR and Fc γ R, respectively; Fig. 6, *A* and *B*). LPS-treated macrophages, incubated in normoxia, also showed increased binding and internalization of opsonized SRBC (Fig. 6, *A* and *B*).

To determine whether the increased binding of particles to macrophages, after hypoxia treatment was mediated by regulating the expression of phagocytic receptors, flow cytometry analyses were performed. Both receptors CR (CD11b/CD18) and Fc γ R were

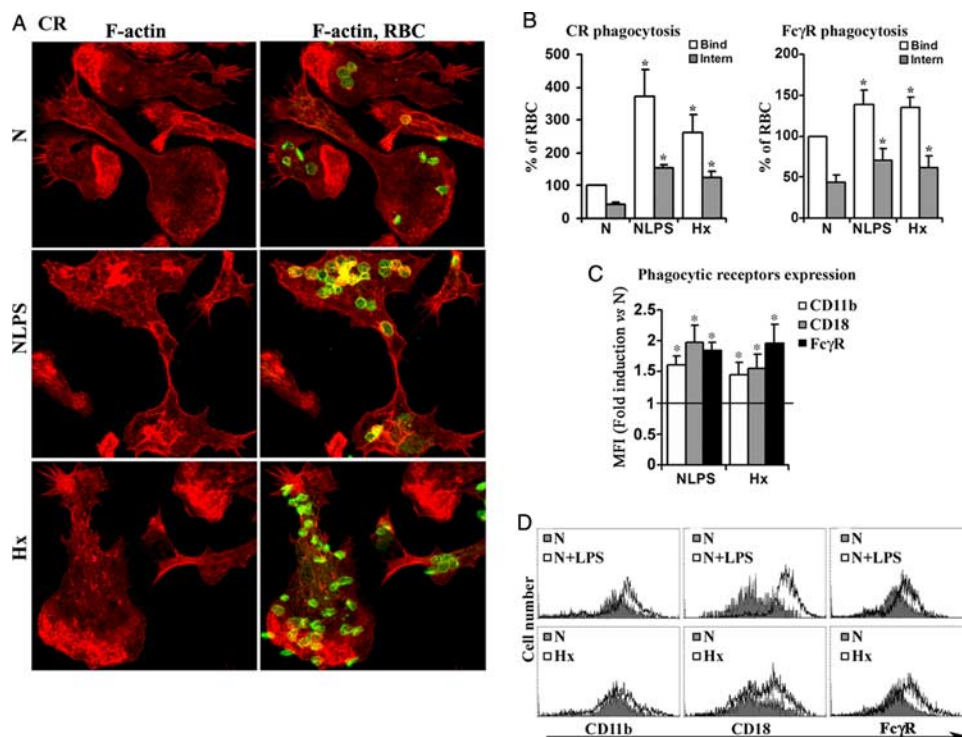


FIGURE 6. Phagocytosis through CR and FcγR is increased in primary macrophages cultured in hypoxia. *A*, Phagocytosis assays were performed in the different cultured macrophages as in Fig. 1, and cells were fixed and stained for F-actin (red, *left panel*) and for SRBC (green); merged images are shown in the *right panel*. *B*, Particle binding and internalization were quantified by counting 500 macrophages in duplicate per condition in each experiment. Results are expressed as the percentage of bound or internalized particles in macrophages (see *Materials and Methods*) cultured under the different conditions. Results were normalized compared with normoxia and are the mean of six different experiments. *C* and *D*, Cytometric analysis of CD11b, CD18, and FcγR were performed as in Fig. 1*A*. Results are expressed as the mean fluorescence intensity (MFI), normalized to normoxia expression, and are the mean of five different experiments. *B* and *C*, Error bars refer to SEM (*, $p < 0.05$). *D*, Representative overlay histograms comparing normoxia-cultured macrophages to LPS-treated macrophages (*upper histograms*) or to hypoxia-cultured macrophages (*lower histograms*).

up-regulated during hypoxia, as well as in LPS-treated macrophages (Fig. 6, *C* and *D*). These results indicate that hypoxia promotes increased binding and internalization of particles by up-regulating CR and FcγR expression levels, thus leading to a more efficient phagocytosis. Together with the data above, our results indicate that macrophage functions of inflammatory cytokine production, Ag presentation, and phagocytosis are induced upon low oxygen tensions.

HIF-1α through IFN-γ is responsible for the hypoxic-induced increment in productive IS formation and phagocytic activity

Taken into account that HIF-1α regulates IFN-γ production under hypoxia exposure, we assessed the direct role of either HIF-1α or IFN-γ in the IS response and the phagocytic activity of macrophages. Thus, mouse peritoneal-elicited macrophages were transfected with either HIF-1α or IFN-γ siRNAs, cultured under hypoxia, and their functionality was tested. IFN-γ siRNA notably reduced the transcription of IFN-γ as well as the siRNA to HIF-1α did (85–90% reduction approximately). The effect of HIF-1α interference was also confirmed with an ~60% reduction in the mRNA levels of BNIP-3 (a HIF-1α-dependent gene (48, 49)), compared with macrophages transfected with siSCR in hypoxia ($p < 0.05$; Fig. 7*A*). When Ag-loaded macrophages were conjugated with CD8 T cells, the recruitment of active TCR/CD3ε to the contact site was assessed. The induction levels in the recruitment observed with the siSCR in hypoxia compared with normoxia were almost completely lost with HIF-1α or IFN-γ interference (Fig. 7*B*). HIF-1α or IFN-γ siRNAs also decreased the CR or FcγR phagocytosis hypoxic induction (Fig. 7*C*).

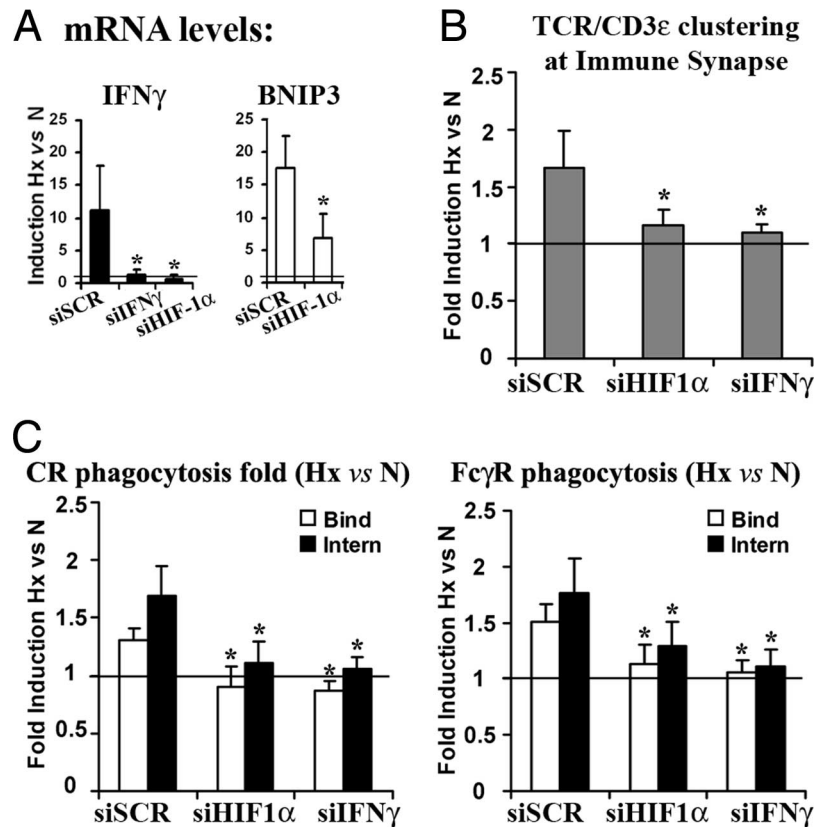
These data demonstrate that HIF-1α-mediated induction of IFN-γ in hypoxia is responsible for the increase in macrophage-dependent IS formation and phagocytic activity.

Discussion

In the present work, we have characterized the inflammatory phenotype of macrophages exposed to low oxygen tensions. We have shown that upon hypoxia macrophages increased the production of IFN-γ, which relies on HIF-1α binding to the new, functional HRE site on the IFN-γ promoter. Moreover, hypoxic macrophages were able to form IS and to phagocytose more efficiently than in normoxia and, more importantly, these effects were mediated through HIF-1α and IFN-γ.

Our results indicate that macrophages in hypoxia induced an increment in IFN-γ and IL-12 mRNA and protein secretion levels, while the anti-inflammatory cytokine IL-10 mRNA remained constant, suggesting that proinflammatory cytokines may be involved in the activated phenotype of macrophages. It has long been thought that only T cells or NK cells were responsible for IFN-γ secretion; however, several studies have described a role for macrophages and dendritic cells as IFN-γ-producing cells, in an autocrine or a paracrine manner (13–15, 17–20). These results were also corroborated by the increased IFN-γ mRNA transcription levels in macrophages from mice exposed *in vivo* to hypoxia. IL-12 and IL-18 induce macrophages to secrete IFN-γ (17), but it may occur that IFN-γ induces macrophages to secrete more IFN-γ as well as IL-12. These cytokines can induce signaling cascades that

FIGURE 7. RNA interference of IFN- γ or HIF-1 α inhibits the hypoxia-increased efficiency of IS and phagocytic activity. **A**, Mouse-elicited peritoneal macrophages were transfected with siRNA control (siSCR), siIFN- γ , or siHIF-1 α and incubated in normoxia/hypoxia for 40 h. mRNA levels of IFN- γ and BNIP-3 after interference are shown. **B**, Conjugates were formed during 20 min between the different cultured macrophages (as in Fig. 5), fixed, and stained for active TCR/CD3 ϵ conformation with APA1/1 Ab and for α -tubulin. The number of T cells with active TCR/CD3 ϵ recruited to the contact site was quantified and expressed as the percentage of the conjugates formed. **C**, Phagocytosis assays were performed, and the percentage of binding and percentage of internalization were quantified (A–C). Data are represented as the fold induction of hypoxia vs normoxia and are the mean \pm SEM of three experiments (*, $p < 0.01$).



increase the bactericidal capacity after phagocytosis, the costimulatory and Ag-presenting molecule expression, as well as the induction of CD8 $^{+}$ T cell differentiation to CTLs (21–23, 51). Moreover, our RNA interference data demonstrate that IFN- γ mediates the hypoxia-induced increment in the formation of productive IS as well as the phagocytic binding and uptake.

The hypoxia-inducible transcription factor HIF-1 α plays a direct role in macrophage activation, since RNA interference of HIF-1 α correlated with an almost total reduction of the hypoxia-mediated enhancement of IFN- γ transcription, and, in addition, resident macrophages from HIF-1 α flox-LysMCre mice were unable to induce IFN- γ levels. We herein describe a novel mechanism for HIF-1 α involvement in macrophage IFN- γ production based on several experimental evidences: 1) the existence of a HRE in the IFN- γ promoter conserved among different mammalian species, 2) HIF-1 α binds to the IFN- γ promoter *in vivo*, and 3) this promoter sequence is transcriptionally functional and depends on the HRE site, since when mutated the transcriptional activity is lost. Other cytokines secreted by macrophages have promoters that also contain HRE sites, such as TNF- α , IL-6, or IL-8 (52, 53); however, for TNF- α and IL-6 it is not known whether these sites are functional. Since HIF-1 α binds to the IFN- γ promoter at early time points of hypoxia exposure (6 h; Fig. 4B), but mRNA induction is not detected until 24 h (Fig. 2A), it is conceivable that other hypoxia-dependent coactivators could be required for its transcription. In this regard, AP-1 and STAT-4 have been reported to regulate IFN- γ transcription, to interact with HIF1- α (20, 54, 55), and, in the case of AP-1, to be activated by hypoxia (56, 57). However, it is still unknown whether there is any correlation between STAT-4 activation by hypoxia and IFN- γ transcription. Therefore, hypoxia through HIF-1 α may induce the secretion of different cytokines that are responsible for the inflammatory phenotype of macrophages and the up-regulation of Ag-presenting, costimulatory molecules and phagocytic receptors.

Macrophages play a key role in innate immunity since they can recognize, ingest, and destroy pathogens by themselves. Phagocytosis efficiency has been reported to be increased by hypoxia. On one hand, the bactericidal capacity of macrophages in hypoxia is increased (33, 58, 59). On the other hand, hypoxia reoxygenation treatments increased *in vivo* Fc γ R-mediated phagocytosis (60). In our model of hypoxic macrophages, we have also found an increased rate of not only Fc γ R phagocytosis, but also CR phagocytosis. We observed the up-regulation of the phagocytic receptor molecules expression on macrophages, CD11b, CD18, and Fc γ R, which may account, in part, for the increased particle binding detected in our assays. In contrast, other nonopsonized pathogens are internalized with the same efficiency independently of different oxygen levels, although it is not known whether the expression of the phagocytic receptors involved in this particular uptake could be regulated through hypoxia. Moreover, as stated above, HIF-1 α regulation of IFN- γ is a key event in the phagocytic efficiency induced by hypoxia.

Our results show that hypoxia, without any other costimuli, primes macrophages to secrete proinflammatory cytokines and to present Ags efficiently. In this regard, hypoxia-activated macrophages increased the expression of the costimulatory and Ag-presenting molecules CD40, CD86, and MHC-I, which could prepare the macrophage for a prompt and efficient response. Therefore, when T cells contact with hypoxia-activated macrophages, in the presence of a specific Ag, a potent T cell cytokine response is achieved. These efficient cytokine-producing IS correlate with a high induction of the TCR/CD3 ϵ active conformation, as well as the tyrosine phosphorylation of the TCR/CD3 ζ chain and of the proximal TCR signaling molecule LAT. The up-regulation of macrophage costimulatory molecules as well as macrophage cytokine production (IFN- γ and IL-12) by hypoxia may explain the enhanced Ag-presenting capacity and efficient IS formation.

Macrophages can be differently activated through a variety of stimuli (61). Hypoxia-stimulated macrophages could mimic M1 classically activated macrophages in a similar manner as LPS-activated macrophages. In fact, the classical activation triggers proinflammatory cytokine secretion, which match our data on the increment of the proinflammatory cytokines IFN- γ and IL-12, together with the increase of IL-6, reactive oxygen species and NO synthesis previously described (53, 59, 62, 63). Therefore, hypoxia could be acting as a priming step preparing the macrophage for an active response. In addition to hypoxia, LPS or other inflammatory signals may act either synergistic or antagonistically inducing further activation or inhibition of the macrophage (18, 62, 64), in particular, in the development of LPS-induced sepsis (53), atheroma plaque formation or tissue remodeling. Further studies on these responses are needed to understand the cross-talk between the different pathways involved in macrophage modulation.

In summary, our data provide several pieces of evidence indicating that oxygen sensing by macrophages regulates their functions: Ag presentation, phagocytosis, and cytokine production. More importantly, a mechanism of activation has been proposed, in which HIF-1 α binds to and activates IFN- γ promoter mediating IFN- γ production, which is involved in the acquisition of a macrophage-activated phenotype.

Acknowledgments

We thank Dr. L. del Peso for the use of HRE localization software, suggestions, and advice; A. Lamana for the RT-PCR primers, and J. Lazcano and B. Alarcón for providing us with OT-I mice. We also thank E. Fuertes and A. Vara Vega for technical advice and support.

Disclosures

The authors have no financial conflict of interest.

References

- Maxwell, P. H., C. W. Pugh, and P. J. Ratcliffe. 2001. The pVHL-HIF-1 system: a key mediator of oxygen homeostasis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 502: 365–376.
- Semenza, G. L. 2001. HIF-1, O₂, and the 3 PHDs: how animal cells signal hypoxia to the nucleus. *Cell* 107: 1–3.
- Levy, A. P., N. S. Levy, S. Wegner, and M. A. Goldberg. 1995. Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia. *J. Biol. Chem.* 270: 13333–13340.
- Liu, Y., S. R. Cox, T. Morita, and S. Kourembanas. 1995. Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells: identification of a 5' enhancer. *Circ. Res.* 77: 638–643.
- Ebert, B. L., J. D. Firth, and P. J. Ratcliffe. 1995. Hypoxia and mitochondrial inhibitors regulate expression of glucose transporter-1 via distinct *cis*-acting sequences. *J. Biol. Chem.* 270: 29083–29089.
- Hayashi, M., M. Sakata, T. Takeda, T. Yamamoto, Y. Okamoto, K. Sawada, A. Kimura, R. Minekawa, M. Tahara, K. Tasaka, and Y. Murata. 2004. Induction of glucose transporter 1 expression through hypoxia-inducible factor 1 α under hypoxic conditions in trophoblast-derived cells. *J. Endocrinol.* 183: 145–154.
- del Peso, L., M. C. Castellanos, E. Temes, S. Martin-Puig, Y. Cuevas, G. Olmos, and M. O. Landazuri. 2003. The von Hippel Lindau/hypoxia-inducible factor (HIF) pathway regulates the transcription of the HIF-proline hydroxylase genes in response to low oxygen. *J. Biol. Chem.* 278: 48690–48695.
- Bruick, R. K., and S. L. McKnight. 2001. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science* 294: 1337–1340.
- Epstein, A. C., J. M. Gleadle, L. A. McNeill, K. S. Hewitson, J. O'Rourke, D. R. Mole, M. Mukherji, E. Metzger, M. I. Wilson, A. Dhanda, et al. 2001. C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell* 107: 43–54.
- Maxwell, P. H., M. S. Wiesener, G. W. Chang, S. C. Clifford, E. C. Vaux, M. E. Cockman, C. C. Wykoff, C. W. Pugh, E. R. Maher, and P. J. Ratcliffe. 1999. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 399: 271–275.
- Bajtaj, Z., E. Csomor, N. Sandor, and A. Erdei. 2006. Expression and role of Fc- and complement-receptors on human dendritic cells. *Immunol. Lett.* 104: 46–52.
- Helmy, K. Y., K. J. Katschke, Jr., N. N. Gorgani, N. M. Kljavin, J. M. Elliott, L. Diehl, S. J. Scales, N. Ghilardi, and M. van Lookeren Campagne. 2006. CRIg: a macrophage complement receptor required for phagocytosis of circulating pathogens. *Cell* 124: 915–927.
- Di Marzio, P., P. Puddu, L. Conti, F. Belardelli, and S. Gessani. 1994. Interferon γ upregulates its own gene expression in mouse peritoneal macrophages. *J. Exp. Med.* 179: 1731–1736.
- Frucht, D. M., T. Fukao, C. Bogdan, H. Schindler, J. J. O'Shea, and S. Koyasu. 2001. IFN- γ production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge. *Trends Immunol.* 22: 556–560.
- Fultz, M. J., S. A. Barber, C. W. Dieffenbach, and S. N. Vogel. 1993. Induction of IFN- γ in macrophages by lipopolysaccharide. *Int. Immunol.* 5: 1383–1392.
- Le Page, C., P. Genin, M. G. Baines, and J. Hiscott. 2000. Interferon activation and innate immunity. *Rev. Immunogenet.* 2: 374–386.
- Munder, M., M. Mallo, K. Eichmann, and M. Modolell. 1998. Murine macrophages secrete interferon γ upon combined stimulation with interleukin (IL)-12 and IL-18: a novel pathway of autocrine macrophage activation. *J. Exp. Med.* 187: 2103–2108.
- Murata, Y., T. Ohteki, S. Koyasu, and J. Hamuro. 2002. IFN- γ and pro-inflammatory cytokine production by antigen-presenting cells is dictated by intracellular thiol redox status regulated by oxygen tension. *Eur. J. Immunol.* 32: 2866–2873.
- Puddu, P., L. Fantuzzi, P. Borghi, B. Varano, G. Rainaldi, E. Guillemard, W. Malorni, P. Nicaise, S. F. Wolf, F. Belardelli, S. Gessani. 1997. IL-12 induces IFN- γ expression and secretion in mouse peritoneal macrophages. *J. Immunol.* 159: 3490–3497.
- Schindler, H., M. B. Lutz, M. Rollinghoff, and C. Bogdan. 2001. The production of IFN- γ by IL-12/IL-18-activated macrophages requires STAT4 signaling and is inhibited by IL-4. *J. Immunol.* 166: 3075–3082.
- Doody, G. M., S. Stephenson, C. McManamy, and R. M. Tooze. 2007. PRDM1/BLIMP-1 modulates IFN- γ -dependent control of the MHC class I antigen-processing and peptide-loading pathway. *J. Immunol.* 179: 7614–7623.
- Giroux, M., M. Schmidt, and A. Descoteaux. 2003. IFN- γ -induced MHC class II expression: transactivation of class II transactivator promoter IV by IFN regulatory factor-1 is regulated by protein kinase C- α . *J. Immunol.* 171: 4187–4194.
- Haring, J. S., G. A. Corbin, and J. T. Harty. 2005. Dynamic regulation of IFN- γ signaling in antigen-specific CD8⁺ T cells responding to infection. *J. Immunol.* 174: 6791–6802.
- Dustin, M. L., M. W. Olszowy, A. D. Holdorf, J. Li, S. Bromley, N. Desai, P. Widder, F. Rosenberger, P. A. van der Merwe, P. M. Allen, and A. S. Shaw. 1998. A novel adaptor protein orchestrates receptor patterning and cytoskeletal polarity in T-cell contacts. *Cell* 94: 667–677.
- Monks, C. R., B. A. Freiberg, H. Kupfer, N. Sciaky, and A. Kupfer. 1998. Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature* 395: 82–86.
- Bunnell, S. C., V. Kapoor, R. P. Tribble, W. Zhang, and L. E. Samelson. 2001. Dynamic actin polymerization drives T cell receptor-induced spreading: a role for the signal transduction adaptor LAT. *Immunity* 14: 315–329.
- Dustin, M. L., and J. A. Cooper. 2000. The immunological synapse and the actin cytoskeleton: molecular hardware for T cell signaling. *Nat. Immunol.* 1: 23–29.
- Grakoui, A., S. K. Bromley, C. Sumen, M. M. Davis, A. S. Shaw, P. M. Allen, and M. L. Dustin. 1999. The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* 285: 221–227.
- Lewis, J. S., J. A. Lee, J. C. Underwood, A. L. Harris, and C. E. Lewis. 1999. Macrophage responses to hypoxia: relevance to disease mechanisms. *J. Leukocyte Biol.* 66: 889–900.
- Murdoch, C., and C. E. Lewis. 2005. Macrophage migration and gene expression in response to tumor hypoxia. *Int. J. Cancer.* 117: 701–708.
- Burke, B., N. Tang, K. P. Corke, D. Tazzyman, K. Ameri, M. Wells, and C. E. Lewis. 2002. Expression of HIF-1 α by human macrophages: implications for the use of macrophages in hypoxia-regulated cancer gene therapy. *J. Pathol.* 196: 204–212.
- Talks, K. L., H. Turley, K. C. Gatter, P. H. Maxwell, C. W. Pugh, P. J. Ratcliffe, and A. L. Harris. 2000. The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1 α and HIF-2 α in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *Am. J. Pathol.* 157: 411–421.
- Cramer, T., Y. Yamanishi, B. E. Clausen, I. Forster, R. Pawlinski, N. Mackman, V. H. Haase, R. Jaenisch, M. Corr, V. Nizet, et al. 2003. HIF-1 α is essential for myeloid cell-mediated inflammation. *Cell* 112: 645–657.
- Hollander, A. P., K. P. Corke, A. J. Freemont, and C. E. Lewis. 2001. Expression of hypoxia-inducible factor 1 α by macrophages in the rheumatoid synovium: implications for targeting of therapeutic genes to the inflamed joint. *Arthritis Rheum.* 44: 1540–1544.
- Hogquist, K. A., S. C. Jameson, W. R. Heath, J. L. Howard, M. J. Bevan, and F. R. Carbone. 1994. T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell* 76: 17–27.
- Olazabal, I. M., N. B. Martin-Cofreces, M. Mittelbrunn, G. Martinez Del Hoyo, B. Alarcon, and F. Sanchez-Madrid. 2008. Activation outcomes induced in naive CD8 T cells by macrophages primed via "phagocytic" and non-"phagocytic" pathways. *Mol. Biol. Cell* 19: 701–710.
- Sahuquillo, A. G., A. Roumier, E. Teixeira, R. Bragado, and B. Alarcon. 1998. T cell receptor (TCR) engagement in apoptosis-defective, but interleukin 2 (IL-2)-producing, T cells results in impaired ZAP70/CD3- ζ association. *J. Exp. Med.* 187: 1179–1192.
- Pescador, N., Y. Cuevas, S. Naranjo, M. Alcaide, D. Villar, M. O. Landazuri, and L. Del Peso. 2005. Identification of a functional hypoxia-responsive element that regulates the expression of the egl nine homologue 3 (egl3n3/phd3) gene. *Biochem. J.* 390: 189–197.
- Risueno, R. M., D. Gil, E. Fernandez, F. Sanchez-Madrid, and B. Alarcon. 2005. Ligand-induced conformational change in the T-cell receptor associated with productive immune synapses. *Blood* 106: 601–608.
- Risueno, R. M., H. M. van Santen, and B. Alarcon. 2006. A conformational change senses the strength of T cell receptor-ligand interaction during thymic selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 9625–9630.

41. Casey, K. A., and M. F. Mescher. 2007. IL-21 promotes differentiation of naive CD8 T cells to a unique effector phenotype. *J. Immunol.* 178: 7640–7648.
42. Olazabal, I. M., E. Caron, R. C. May, K. Schilling, D. A. Knecht, and L. M. Machesky. 2002. Rho-kinase and myosin-II control phagocytic cup formation during CR, but not Fc γ R, phagocytosis. *Curr. Biol.* 12: 1413–1418.
43. Blouin, C. C., E. L. Page, G. M. Soucy, and D. E. Richard. 2004. Hypoxic gene activation by lipopolysaccharide in macrophages: implication of hypoxia-inducible factor 1 α . *Blood* 103: 1124–1130.
44. Frede, S., C. Stockmann, P. Freitag, and J. Fandrey. 2006. Bacterial lipopolysaccharide induces HIF-1 activation in human monocytes via p44/42 MAPK and NF- κ B. *Biochem. J.* 396: 517–527.
45. Wiesener, M. S., H. Turley, W. Allen, C. Willam, K. U. Eckardt, K. Talks, S. M. Wood, K. C. Gatter, A. L. Harris, C. W. Pugh, et al. 1998. Induction of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia: characterization and comparison with hypoxia-inducible factor-1 α . *Blood* 92: 2260–2268.
46. Asikainen, T. M., B. K. Schneider, N. S. Waleh, R. I. Clyman, W. B. Ho, L. A. Flippin, V. Gunzler, and C. W. White. 2005. Activation of hypoxia-inducible factors in hyperoxia through prolyl 4-hydroxylase blockade in cells and explants of primate lung. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102: 10212–10217.
47. Milkiewicz, M., C. W. Pugh, and S. Egginton. 2004. Inhibition of endogenous HIF inactivation induces angiogenesis in ischaemic skeletal muscles of mice. *J. Physiol.* 560: 21–26.
48. Guo, K., G. Searfoss, D. Krolkowski, M. Pagnoni, C. Franks, K. Clark, K. T. Yu, M. Jaye, and Y. Ivashchenko. 2001. Hypoxia induces the expression of the proapoptotic gene BNIP3. *Cell Death Differ.* 8: 367–376.
49. Sowter, H. M., P. J. Ratcliffe, P. Watson, A. H. Greenberg, and A. L. Harris. 2001. HIF-1-dependent regulation of hypoxic induction of the cell death factors BNIP3 and NIX in human tumors. *Cancer Res.* 61: 6669–6673.
50. Martin-Cofreces, N. B., J. Robles-Valero, J. R. Cabrero, M. Mittelbrunn, M. Gordon-Alonso, C. H. Sung, B. Alarcon, J. Vazquez, and F. Sanchez-Madrid. 2008. MTOC translocation modulates IS formation and controls sustained T cell signaling. *J. Cell Biol.* 182: 951–962.
51. Nguyen, V. T., and E. N. Benveniste. 2000. Involvement of STAT-1 and ets family members in interferon- γ induction of CD40 transcription in microglia/macrophages. *J. Biol. Chem.* 275: 23674–23684.
52. Kim, K. S., V. Rajagopal, C. Gonsalves, C. Johnson, and V. K. Kalra. 2006. A novel role of hypoxia-inducible factor in cobalt chloride- and hypoxia-mediated expression of IL-8 chemokine in human endothelial cells. *J. Immunol.* 177: 7211–7224.
53. Peyssonnaud, C., P. Cejudo-Martin, A. Doedens, A. S. Zinkernagel, R. S. Johnson, and V. Nizet. 2007. Cutting edge: essential role of hypoxia inducible factor-1 α in development of lipopolysaccharide-induced sepsis. *J. Immunol.* 178: 7516–7519.
54. Khomenko, T., X. Deng, Z. Sandor, A. S. Tarnawski, and S. Szabo. 2004. Cysteamine alters redox state, HIF-1 α transcriptional interactions and reduces duodenal mucosal oxygenation: novel insight into the mechanisms of duodenal ulceration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 317: 121–127.
55. Lawless, V. A., S. Zhang, O. N. Ozes, H. A. Bruns, I. Oldham, T. Hoey, M. J. Grusby, and M. H. Kaplan. 2000. Stat4 regulates multiple components of IFN- γ -inducing signaling pathways. *J. Immunol.* 165: 6803–6808.
56. Kunz, M., and S. M. Ibrahim. 2003. Molecular responses to hypoxia in tumor cells. *Mol. Cancer* 2: 23–36.
57. Rupec, R. A., and P. A. Baeuerle. 1995. The genomic response of tumor cells to hypoxia and reoxygenation: differential activation of transcription factors AP-1 and NF- κ B. *Eur. J. Biochem.* 234: 632–640.
58. Colhoun, M. C., W. W. Arrais-Silva, C. Picoli, and S. Giorgio. 2004. Effect of hypoxia on macrophage infection by *Leishmania amazonensis*. *J. Parasitol.* 90: 510–515.
59. Peyssonnaud, C., V. Datta, T. Cramer, A. Doedens, E. A. Theodorakis, R. L. Gallo, N. Hurtado-Ziola, V. Nizet, and R. S. Johnson. 2005. HIF-1 α expression regulates the bactericidal capacity of phagocytes. *J. Clin. Invest.* 115: 1806–1815.
60. Anand, R. J., S. C. Gribar, J. Li, J. W. Kohler, M. C. Branca, T. Dubowski, C. P. Sodhi, and D. J. Hackam. 2007. Hypoxia causes an increase in phagocytosis by macrophages in a HIF-1 α -dependent manner. *J. Leukocyte Biol.* 82: 1257–1265.
61. Gordon, S. 2003. Alternative activation of macrophages. *Nat. Rev. Immunol.* 3: 23–35.
62. Nishi, K., T. Oda, S. Takabuchi, S. Oda, K. Fukuda, T. Adachi, G. L. Semenza, K. Shingu, and K. Hirota. 2008. LPS induces hypoxia-inducible factor 1 activation in macrophage-differentiated cells in a reactive oxygen species-dependent manner. *Antioxid. Redox Signal.* 10: 983–995.
63. Yoshida, K., K. Kirito, H. Yongzhen, K. Ozawa, K. Kaushansky, and N. Komatsu. 2008. Thrombopoietin (TPO) regulates HIF-1 α levels through generation of mitochondrial reactive oxygen species. *Int. J. Hematol.* 88: 43–51.
64. Mi, Z., A. Rapisarda, L. Taylor, A. Brooks, M. Creighton-Gutteridge, G. Melillo, and L. Varesio. 2008. Synergistic induction of HIF-1 α transcriptional activity by hypoxia and lipopolysaccharide in macrophages. *Cell Cycle* 7: 232–241.

Activation of HIF-prolyl Hydroxylases by R59949, an Inhibitor of the Diacylglycerol Kinase*

Received for publication, December 30, 2004, and in revised form, April 18, 2005
Published, JBC Papers in Press, April 23, 2005, DOI 10.1074/jbc.M414694200

Elisa Temes^{§§}, Silvia Martín-Puig^{¶¶}, Bárbara Acosta-Iborra^{||}, María C. Castellanos^{**},
Mónica Feijoo-Cuaresma[§], Gemma Olmos^{‡‡}, Julián Aragonés^{§§}, and Manuel O. Landazuri^{¶¶}

From the Servicio de Inmunología, Hospital de la Princesa, Universidad Autónoma de Madrid, Diego de León 62,
28006 Madrid, Spain

Hypoxia-inducible factors (HIF) are heterodimeric (α/β) transcription factors that play a fundamental role in cellular adaptation to low oxygen tension. In the presence of oxygen, the HIF- α subunit becomes hydroxylated at specific prolyl residues by prolyl hydroxylases. This post-translational modification is recognized by the von Hippel-Lindau (VHL) protein, which targets HIF- α for degradation. In the absence of oxygen, HIF- α hydroxylation is compromised and this subunit is stabilized. We have previously shown that the hypoxia-induced accumulation of HIF- α protein is strongly impaired by the inhibitor of diacylglycerol kinase, R59949. Here, we have investigated the mechanisms through which this inhibitor exerts its effect. We found that R59949 inhibits the accumulation of HIF-1/2 α protein without affecting the expression of their mRNAs. We also determined that R59949 could only block the accumulation of HIF- α in the presence of VHL protein. In agreement with this, the binding of VHL to endogenous HIF- α was significantly enhanced after R59949 treatment, even under hypoxic conditions. In addition, we found that R59949 could stimulate prolyl hydroxylase both at 21% O₂ as well as at 1% O₂. Taken together, these results reveal that R59949 is an activator of HIF prolyl hydroxylases. This is of particular interest when we consider that, to date, mainly inhibitors of these enzymes have been described.

The best characterized response to hypoxia is the induction of hypoxia-inducible transcription factors (HIFs)¹ (1). These

transcription factors govern the oxygen-dependent induction of different genes, including those encoding vascular endothelial growth factor, erythropoietin, and glycolytic enzymes (2, 3). The HIFs are α/β heterodimers that belong to the basic helix-loop-helix PAS (Per, Arnt, Sim) family of transcription factors (4). The β subunit (HIF-1 β or aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator; ARNT) is constitutively expressed in cells, whereas the expression of the three different HIF- α subunits that have been identified to date (HIF-1 α –3 α), is tightly regulated by oxygen (5). During normoxia, HIF- α subunits are very unstable proteins because of their interaction with the von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor protein (6). The VHL protein is a component of a E3 ubiquitin ligase complex (7) that leads to the ubiquitination and subsequent proteasome-dependent degradation of HIF- α subunits (8). VHL interacts with HIF- α subunits through two independent sites that contain the LXXLAP motif, present in both HIF-1 α and -2 α (9). The hydroxylation of the specific proline residue (underlined and bold) within this conserved box is required for this interaction (10, 11). This oxygen-dependent hydroxylation is catalyzed by a novel group of mammalian proline hydroxylases, PHD1, PHD2 and PHD3, which belong to the iron (II)-2-oxoglutarate-dependent dioxygenase family (12, 13). These three mammalian PHDs each present different subcellular localization (9, 14) and tissue-specific distribution (15). Although the three enzymes have the potential to regulate HIF in cultured cells (13), PHD2 is thought to be the most important in regulating the levels of HIF-1 α during normoxia (16). These enzymes use molecular oxygen and 2-oxoglutarate as co-substrates, and iron and ascorbic acid are additionally required for the hydroxylation reaction (17). Moreover, these PHDs are also thought to be effective oxygen sensors, because their K_m values for O₂ are slightly above the atmospheric O₂ concentration (18). Besides controlling the activity of the PHDs, the concentration of oxygen also controls the transcription of PHD2 and PHD3 mRNA (14, 19).

In the absence of oxygen, VHL cannot recognize HIF- α subunits and as a consequence, HIF activity is concomitantly induced. After the HIF- α subunits translocate to the nucleus, they associate with the β subunit and the HIF α/β heterodimers and then bind specifically to the hypoxia response elements in different target genes (20). The transcriptional activity of HIF is also controlled by the additional hydroxylation of a conserved asparagine residue (Asn-803 in HIF-1 α and Asn-851 in HIF-2 α) located in the C-terminal transactivation domain of HIF- α subunits (21). This hydroxylation blocks the association of the cysteine/histidine-rich (CH-1) domain of the p300 co-activator with HIF and therefore provides a second oxygen-dependent mechanism by which HIF can be regulated.

von Hippel-Lindau; PA, phosphatidic acid; RT, reverse transcription; PBS, phosphate-buffered saline; IP, immunoprecipitation; GST, glutathione S-transferase.

* This work was supported by grants from the Red Temática de Enfermedades Cardiovasculares (RECAVA) (CO3/01), from the Comunidad Autónoma de Madrid (08.3/0031-2003) and from the Ministerio de Ciencia y Tecnología (SAF 2001-0215). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

‡ These authors contributed equally to this work.

§ Supported by a graduate fellowship from RECAVA.

¶ Supported by a graduate fellowship from the Instituto de Salud Carlos III.

|| Supported by a fellowship from the Ministerio de Educación y Ciencia.

** Supported by the Fondo de Investigaciones Sanitarias.

‡‡ Present address: Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Alcalá, Autovía de Aragón Km 33.600, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, Spain.

§§ Present address: Center for Transgene Technology and Gene Therapy, VIB, KuLeuven Campus Gasthuisberg O & N, Herestraat 49, B-3000 Leuven, Belgium.

¶¶ To whom correspondence should be addressed: Servicio de Inmunología, Hospital de la Princesa, Universidad Autónoma de Madrid, Diego de León 62, 28006 Madrid, Spain. Tel.: 34-91-5202662; Fax: 34-91-5202374; E-mail: mortiz.hlpr@salud.madrid.org.

¹ The abbreviations used are: HIF, hypoxia-inducible factor; VHL,

The factor inhibiting HIF is the asparaginyl hydroxylase responsible for this post-translational modification (22, 23). Thus, PHDs and factor-inhibiting HIF are two different HIF hydroxylases that can act as oxygen sensors and control HIF activity (17, 24, 25).

We have previously shown that hypoxia produces an increase in the levels of both diacylglycerol and phosphatidic acid (PA) through the activity of DGK (26, 27). Nine DGK isoforms have so far been described, and these phosphorylate diacylglycerol to generate PA. We have found that the pharmacological inhibition of DGK activity with R59949 (28–30) prevents the accumulation of both PA and the HIF-1 α subunit induced by hypoxia (27). Here we have analyzed the effect of this inhibitor at the critical steps of HIF stabilization and activation pathways. Our data indicate that the mechanism by which this pharmacological agent inhibits hypoxia-regulated HIF involves the activation of HIF prolyl hydroxylases.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Reagents—Antibodies were obtained from the following sources and used at the concentrations indicated: monoclonal HIF-1 α (1:1000, Transduction Laboratories); monoclonal (ab8365) and polyclonal (ab199) HIF-2 α (1:500, Novus Biologicals); monoclonal pVHL (1:500, Transduction Laboratories); polyclonal PHD1 (1:1000, Bethyl Laboratories); polyclonal PHD2 (1:1000, Bethyl Laboratories); polyclonal PHD3 (1:2000, Bethyl Laboratories); monoclonal α -tubulin (1:2000, Sigma); and polyclonal Sp-1 (1:2000, Santa Cruz Biotechnology). Horseradish peroxidase-coupled sheep anti-mouse antibody was obtained from Pierce, and the anti-rabbit horseradish peroxidase antibody was from Amersham Biosciences. The DGK inhibitor II (R59949) was purchased from Calbiochem and the [32 P]orthophosphate (carrier-free) from Amersham Biosciences. Silica gel thin layer chromatography plates (60 Å, LK6D) were obtained from Whatman. The authentic phospholipid standards 1,2-dioleoylglycerol and 1,2-dioleoylphosphatidic acid were from Sigma. Analytic grade organic solvents for thin layer chromatography were purchased from Merck. Minimum essential medium without phosphates was obtained from ICN Biomedicals.

Cell Culture and Hypoxic Conditions—VHL-deficient 786-O-(1–115) cells or PRC3 (31), RCC10 (32), UMRC6 (33) and their corresponding clones derived from stable transfection of VHL, 786-O-WT10, VHL53, and UMRC 3–4, as well as human embryonic kidney cells 293-T, were maintained in RPMI 1640 medium with GLUTAMAX-I (Invitrogen) supplemented with 10% fetal calf serum (Linus). HeLa cells were grown in Dulbecco's minimal essential medium (Biocrom KG) supplemented with 5% fetal calf serum. The cells were routinely cultured in 95% air and 5% CO₂ (normoxic conditions) at 37 °C. To expose the cells to hypoxia, they were placed in an airtight chamber with inflow and outflow valves, which was infused with a mixture of 1% O₂, 5% CO₂, 94% N₂ (S.E. Carbueros Metalicos S.A.). Alternatively, they were placed in an *in vivo* 400 hypoxia work station (Ruskinn Technology). In all experiments, cells were plated at 70–90% confluence, and when completely attached, they were exposed to normoxia or hypoxia for 5–6 h. When R59949 was used, it was added 1 h before any other treatments, and for these experiments, cells were grown in fetal calf serum-free medium.

Western Blotting—Proteins from total cell lysates were resolved on 8–12% SDS-polyacrylamide gels. The proteins were then transferred to a nitrocellulose membrane (Bio-Rad), blocked with 5% nonfat dry milk in TBS-T (50 mM Tris, pH 7.6, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20) and incubated overnight at 4 °C with the antibodies indicated. Immunolabeling was detected by enhanced chemiluminescence (ECL, Amersham Biosciences; Supersignal West Femto, Pierce) and visualized with a digital luminescent image analyzer (FUJIFILM LAS-1000 CH).

Quantitative Reverse Transcription (RT)-PCR—Cells treated under different conditions were harvested in 1 ml of Ultraspec reagent (Biotecx). Total RNA was extracted and quantified, and the integrity of the RNA was tested by gel electrophoresis. 1 μ g of the total RNA extracted from each sample was retrotranscribed to cDNA (Improm-II reverse transcriptase, Promega), and 1–3 μ l of this cDNA were used as a template for PCR amplification. The reactions were performed with the LC FastStart DNA master SYBR Green I kit (Roche Applied Science) following the manufacturer's instructions. PCR amplifications were carried out in a LightCycler system (Roche Applied Science), and the data were analyzed with LightCycler software 3 version 3.5.28 (Idaho Technology Inc.). For analytic purposes, the amplicon for each of the

genes analyzed was cloned, and known amounts of the cloned product were used to generate a standard curve. The number of copies of the gene of interest in each sample was extrapolated from the corresponding standard curve. For each sample, duplicate determinations were carried out, and the gene copy number was normalized to the amount of β -actin. The primer pairs used in this study have been reported elsewhere (34).

Measurement of [32 P]Phosphatidic Acid—Cells were cultured in phosphate-free medium in the presence or absence of 10% (v/v) fetal calf serum (extensively dialyzed against 0.9% (w/v) NaCl) for 90 min before the addition of [32 P]orthophosphate (100 μ Ci/ml) for an additional 90 min. Thereafter, the cells were exposed to normoxia or hypoxia. Phospholipids were then extracted by the method of Bligh and Dyer (35) and analyzed as described previously (27). Quantification of the band corresponding to [32 P]PA was performed using the Image Reader version 1.8 software (Science Lab software, Fuji Photo Film).

HIF-VHL Co-immunoprecipitation

VHL Immunoprecipitation—786-O-WT10 cells were used as a source of VHL protein, as these cells are enriched for this protein through the stable transfection of a VHL expression vector (31). Confluent 100-mm dishes of these cells were washed with PBS and collected in 600 μ l of IP-lysis buffer (0.5% Nonidet P-40, 100 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.6, 5 mM MgCl₂, 10 mM sodium pyrophosphate, 1 mM EGTA, pH 8, 1 mM orthovanadate, 10 mM NaF, 500 μ M phenylmethylsulfonyl fluoride, and a protease inhibitor mixture (Roche Applied Science)). The cells were lysed on ice for 10–15 min, and after centrifugation (17,000 \times g for 15 min), the supernatant was transferred to fresh tubes and precleared with Pansorbin (Calbiochem) for 30 min at 4 °C to avoid nonspecific binding. Subsequently, the supernatant was incubated with 10 μ g of IgG1 isotype negative control (anti-CD45) coupled to protein G-Sepharose beads (Amersham Bioscience) for 1 h at 4 °C. The beads were collected, and 5 μ g of anti-VHL antibody coupled to protein G-Sepharose bead supernatants was added to the supernatant and incubated overnight at 4 °C. The beads were collected, washed twice with IP-lysis buffer, once with PBS, and stored in PBS at 4 °C.

VHL-HIF Binding Assay—VHL-deficient 786-O-(1–115) or PRC3 and RCC10 cells were grown to 90% confluence in 60-mm dishes. After 1 h of pretreatment with 30 μ M R59949 or vehicle (Me₂SO), the cells were maintained in normoxia or placed in a hypoxia work station (1% O₂) for 5 additional hours. The cells were washed with PBS and then collected in 300 μ l of IP-lysis buffer. The cells maintained in an atmosphere of 1% oxygen were lysed inside the work station to avoid reoxygenation. After removal of the cell debris by centrifugation (17,000 \times g for 15 min), the supernatant was transferred to fresh tubes and precleared for 1 h at 4 °C with IgG1, the isotype negative control obtained in the previous paragraph. Thereafter, the VHL previously immunoprecipitated from the 786-O-WT10 cell extract was added to the supernatant and incubated overnight at 4 °C. The beads were collected, washed twice with IP-lysis buffer, once with PBS, and finally 25 μ l of 2 \times loading buffer was added (2% SDS, 10% glycerol, 10 mM dithiothreitol, 62 mM Tris, pH 6.8, and 0.004% bromophenol blue). This mixture was boiled at 95 °C for 5 min, the beads were removed by centrifugation, and the supernatant was loaded onto 10% SDS gels. Western blotting was performed, and the blots were probed with anti-HIF-2 α or -1 α antibodies. An anti-VHL antibody was used as a loading control for immunoprecipitation.

In Vitro VHL Capture Assay—After treatment, 786-O-WT10 cells were harvested in phosphate-buffered saline, and the cell pellet was resuspended in 300 μ l of hypotonic lysis buffer (20 mM Hepes, pH 7.6, 5 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM β -mercaptoethanol, 1 mM dithiothreitol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 25 μ g/ml aprotinin, 5 μ g/ml leupeptin). The cell suspension was incubated at 4 °C for 10–15 min and then forced 10 times through a 22-gauge needle. After removal of the cell debris by centrifugation, the protein concentration was quantified. The hydroxylation reaction was performed by incubating 10 μ g of GST-HIF2 α -(521–542) recombinant protein (34) with 10 μ g of the 786-O-WT10 cell lysate in a final volume of up to 45 μ l with reaction buffer (20 mM Hepes, pH 7.6, 5 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM β -mercaptoethanol, 1 mM dithiothreitol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 260 μ M FeCl₂, 5 mM 2-oxoglutarate, 0.6 mM ascorbic acid). Reactions were carried out at in an atmosphere of 21% O₂ or inside a hypoxia work station at 1% O₂ for 30 min at 30 °C. In conditions of 1% oxygen (hypoxia), the reaction buffer was previously equilibrated to that of the oxygen concentration. Sepharose-GST-HIF complexes were pulled down and resuspended in 200 μ l of binding buffer (50 mM Tris, pH 7.5, 120 mM NaCl, 10% glycerol, 1.5 mM MgCl₂, 5 mM KCl, 0.2% Nonidet P-40, 0.5

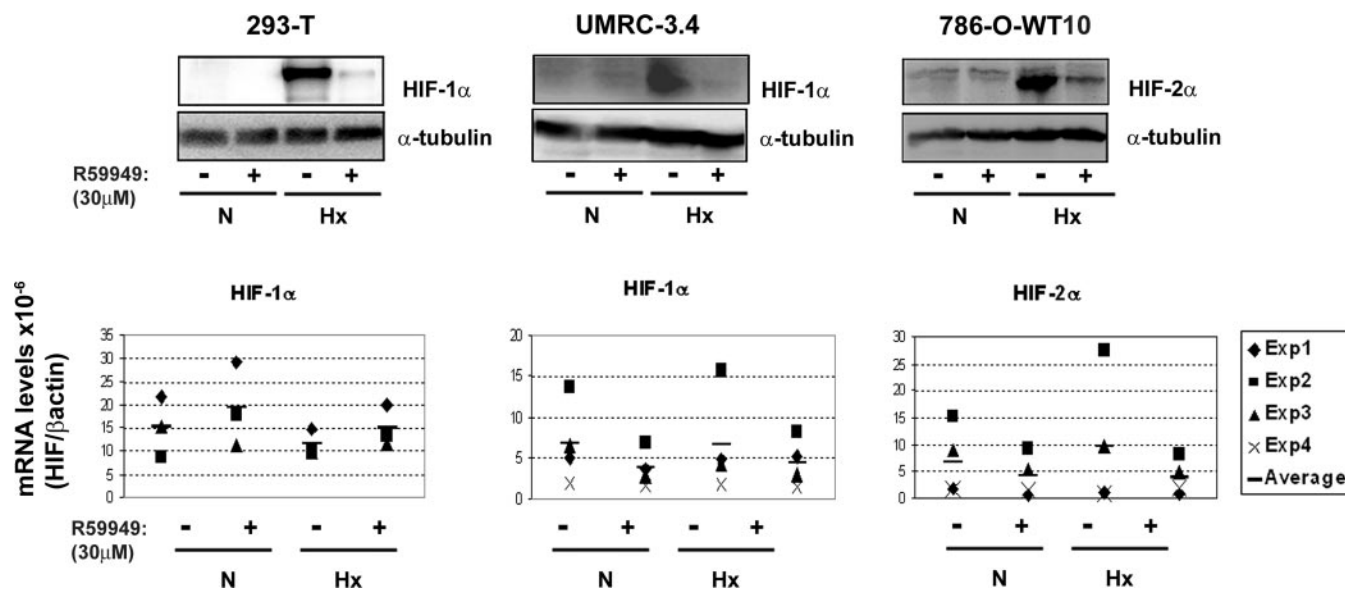


FIG. 1. **R59949 does not alter the levels of HIF- α mRNA.** 293-T, UMRC 3.4 and 786-O-WT10 were pretreated for 1 h with R59949 (+; 30 μ M) or vehicle (-; Me₂SO) and then transferred to conditions of hypoxia (Hx, 1% O₂) or left in conditions of normoxia (N, 21% O₂) for 5–6 h. The levels of HIF-1 α and -2 α protein were determined by Western blot (upper panels), and as a loading control, the membranes were probed with an anti α -tubulin protein antibody. In parallel, the abundance of each HIF mRNA was determined by quantitative RT-PCR. The amounts of HIF-1 α and -2 α were normalized with β -actin in each case. The absolute values obtained in three or four independent experiments performed in duplicate and their averages are shown (lower panels). The Western blots shown are the results of one representative experiment.

mg/ml bovine serum albumin) containing 15 μ l of *in vitro* transcribed/translated [³⁵S]VHL (TnT quick coupled transcription/translation system from Promega). Samples were then incubated at 4 °C for 1 h, the protein complexes were recovered by centrifugation, washed twice with binding buffer, and finally resuspended in 30 μ l of 1 \times loading buffer. Proteins resolved by SDS-PAGE were stained with Coomassie Blue to demonstrate equal GST-HIF-2 loading, fixed (methanol 10%, acetic acid 10%, and glycerol 10%) for 30 min at room temperature, and incubated with Amplify (Amersham Biosciences) for an additional 10–15 min. The gels were exposed to an x-ray film and bound [³⁵S]VHL was detected by autoradiography. To demonstrate the linear conditions in these assays, GST-HIF was exposed to a 2-fold concentration of control cell lysate, in which case about twice the amount of [³⁵S]VHL was recovered. The VHL captured by GST-HIF-2 in the absence of cellular lysate was subtracted from all samples.

RESULTS

R59949 Specifically Inhibits the Accumulation of HIF Protein without Affecting Its mRNA Levels—We previously reported that R59949 inhibits the accumulation and the transcriptional activity of HIF-1 α in cells maintained in atmospheres containing 1% oxygen (27). To identify the mechanisms by which R59949 affects HIF, we first analyzed whether this inhibitor affected the levels of HIF mRNA. As such, we treated 293-T, 786-O-WT10, and UMRC-3.4 cells with R59949 (30 μ M) and maintained them in conditions of normoxia or hypoxia (1% O₂) during 6 h. Subsequently, total protein extracts were obtained, and in parallel, total RNA was isolated and analyzed by quantitative RT-PCR. The accumulation of both HIF-1 α (293-T and UMRC 3.4) and HIF-2 α (786-O-WT10) protein subunits was induced in conditions of hypoxia, and the levels of these proteins was diminished in the presence of R59949 (Fig. 1, upper panels). However, neither hypoxia nor R59949 treatment significantly modified the basal normoxic mRNA levels in any of these cell types (Fig. 1, lower panels; one-way analysis of variance, $p > 0.05$). The minor changes observed on occasion could not account for the strong inhibition observed at the protein level. Therefore, the inhibition of HIF- α protein accumulation promoted by R59949 was not due to a decrease in its mRNA levels.

HIF Protein Inhibition by R59949 Is VHL-dependent—The degradation of HIF protein is regulated by the VHL-proteo-

some pathway (6). As a consequence, the absence of VHL results in the constitutive accumulation of HIF- α proteins in conditions of normoxia, which did not increase further in conditions of hypoxia (Fig. 2, A and B, upper panels) (8, 33). To assess the possible role played by VHL in the inhibitory activity of R59949, we examined how this compound affected VHL-expressing and -non-expressing cells. Exposure to different doses of R59949 had no effect upon the accumulation of HIF- α in VHL-deficient cells (Fig. 2, A and B, left panels). In contrast, we did observe a dose-dependent inhibition of the hypoxia-induced accumulation of the HIF- α subunit in cells expressing VHL (Fig. 2, A and B, right panels). To determine whether the differences between VHL-expressing and -non-expressing cells might be due to variations in the uptake of R59949 and/or the sensitivity to this inhibitor, we determined its effect on the total amount of PA in each cell type. Both basal and hypoxia-induced PA levels were reduced to the same extent in VHL-expressing and -non-expressing cell types (Fig. 2C). Because the PA levels depend on DGK activity, we concluded that R459949 is equally effective in both of these cell types. In addition, given that the steady state levels of HIF- α in VHL-deficient cells are not affected by R59949, this agent did not appear to affect the rate of HIF- α translation.

We then asked whether inhibition of HIF following exposure to R59949 was because of an increase in the expression of the VHL protein. We determined the levels of VHL protein in cell extracts from UMRC-3.4 (Fig. 3A) and 786-O-WT10 (Fig. 3B) treated with different concentrations of R59949 in conditions of normoxia and hypoxia. In contrast to the inhibition on the accumulation of hypoxia-induced HIF- α protein subunits, the presence of R59949 did not affect the levels of VHL protein.

Taken together, these results indicated that VHL protein was required for R59949 to inhibit the hypoxia-induced HIF protein accumulation. However, this inhibitory effect is not a consequence of an increase in VHL expression.

R59949 Treatment Promotes HIF-VHL Binding—On the basis of this data, we examined whether R59949 promoted the association of VHL with HIF proteins. Because VHL binding to hydroxylated HIF leads to its immediate degradation, changes

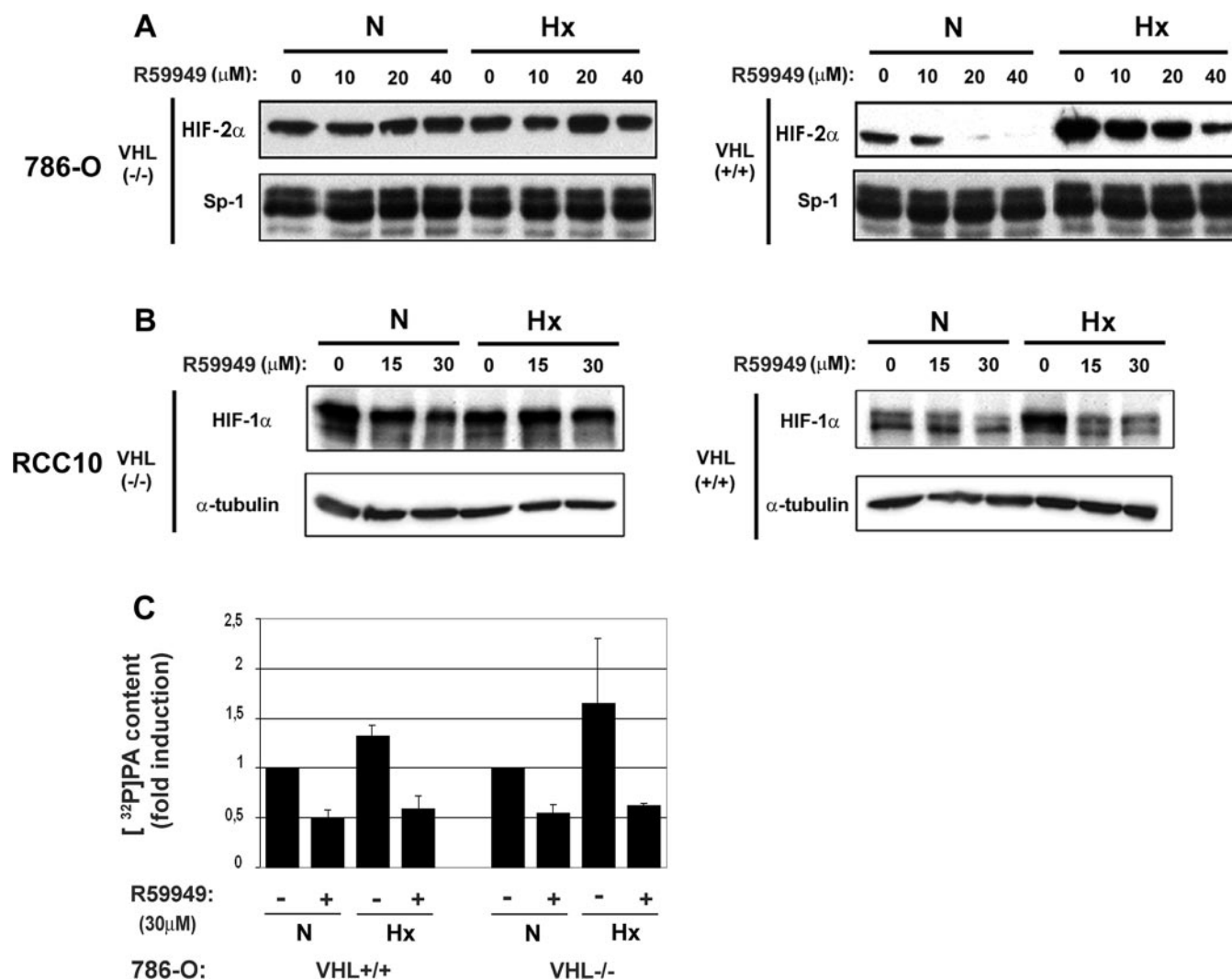


FIG. 2. R59949 does not inhibit HIF accumulation in VHL negative cells. VHL-expressing and -non-expressing 786-O (A) and RCC10 (B) cells were grown to 90% confluence in 6-well plates. The cells were pretreated for 1 h with R59949 at doses between 10 and 40 μ M, as indicated, and then transferred to hypoxic conditions (Hx, 1% O₂) or left in normoxic conditions (N, 21% O₂) for a further 5 h. Total cell extracts were resolved by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes to analyze the levels of HIF proteins using the antibodies indicated. As a loading control, α -tubulin (A) or Sp-1 (B) were also probed in the same membranes. Similar results were obtained in four experiments, and the data shown is from a representative experiment. C, 786-O VHL^{+/+} and VHL^{-/-} cells were metabolically labeled with [³²P]orthophosphate. The cells were then pretreated with R59949 at 30 μ M for 1 h or left untreated prior to maintaining them in conditions of hypoxia (Hx) or normoxia (N) for an additional 6 h. Cellular phospholipids were extracted, and the radiolabeled PA was resolved by thin layer chromatography, visualized by exposure to x-ray film, and quantified. The radiolabeled PA content was corrected to the total amount of labeled material, assigning the value of 1 to the normalized PA level on the normoxic control. Each bar represents the induction of PA (mean \pm range) of two independent experiments performed in triplicate.

in the hydroxylated forms of HIF- α subunits can only be maintained in VHL-non-expressing cells. To analyze how R59949 might affect the recognition of HIF by VHL, we performed *in vitro* HIF-VHL binding assays using HIF protein recovered from RCC10 and 786-O(1–115), cells that lack VHL. These cells were treated with R59949 in conditions of hypoxia or normoxia, and then the cell lysates were incubated with VHL protein isolated from 786-O-WT10. Finally, the formation of complexes between HIF- α subunits and VHL was analyzed by co-immunoprecipitation. We found that VHL bound to HIF-1 α in lysates from normoxic RCC10 cells as well as to HIF-2 α from 786-O(1–115) lysates (Fig. 4). As expected, VHL-HIF binding diminished when the cells were maintained in conditions of hypoxia (Fig. 4). In contrast, when cells were treated with R59949 and entered into hypoxia, VHL-HIF binding increased strongly. These results offer an explanation for how R59949 reduces the stability of the HIF- α protein induced by hypoxia in VHL-positive cells yet is unable to affect HIF-1 α levels in VHL-negative cells. Interestingly, the increase in the VHL-HIF

complexes observed in the presence of this compound under normoxia, could also account for its inhibitory effect on the basal levels of HIF proteins sometimes found in normoxic conditions (see Fig. 2, A and B, upper panels). These results indicated that R59949 treatment directly augmented the ability of VHL to bind to HIF α isoforms, targeting them to the proteasome-dependent degradation pathway.

R59949 Stimulates HIF-PHD Activity—The interaction between HIF and VHL is dependent on HIF hydroxylation by HIF PHDs at specific proline residues. Because R59949 increases HIF-VHL binding, we investigated its effect on PHD activity.

We first studied whether R59949 could influence PHD activity by increasing the level of PHD protein. The amount of the three PHDs was analyzed in cell lysates from 786-O-WT10 cells exposed to R59949 under conditions of normoxia. The presence of R59949 had no effect on the protein levels of any of the PHDs (Fig. 5A). Next, we decided to assay PHD activity on lysates from 786-O-WT10 cells maintained in conditions of normoxia in the presence or absence of R59949. Because VHL binds to HIF

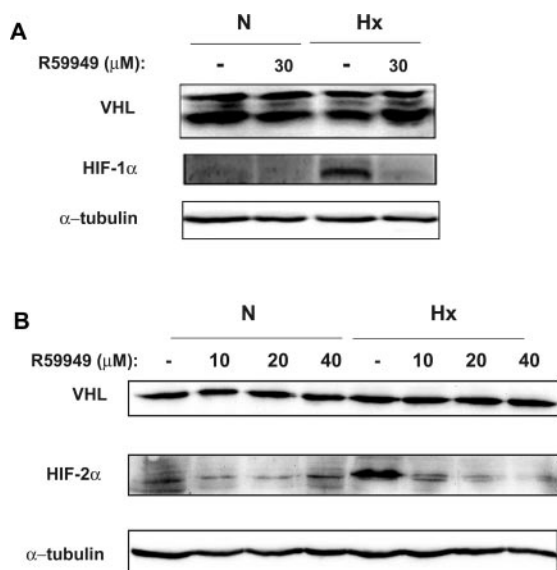


FIG. 3. **R59949 does not inhibit the accumulation of VHL protein.** UMRC-3.4 (A) and 786-O-WT10 (B) cells were grown to 90% confluence in 6-well plates. The cells were pretreated for 1 h with R59949 at the doses indicated and then transferred to conditions of hypoxia (Hx, 1% O₂) or left in normoxic conditions (N, 21% O₂) for a further 5 h. Total cell extracts were resolved by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes to analyze the levels of VHL protein. To ensure the correct function of R59949, HIF-1α and -2α protein levels were also analyzed. As a loading control, α-tubulin was also probed in the same membranes. The experiments shown are representative of the three independent experiments performed. Arrowheads indicate VHL

only when the relevant proline residues have been previously hydroxylated by the PHDs, the binding of *in vitro* translated [³⁵S]VHL to a recombinant GST-HIF construct (VHL capture assay) is considered an indirect measure of PHD activity (10–12,36). Recombinant GST-HIF2, which comprises amino acids 521–542 and includes the Pro-531 residue that is homologous to Pro-564 from HIF-1α, was exposed to normoxic lysates from R59949- or mock-treated cells. The hydroxylation reaction was allowed to proceed for 30 min. The different samples were then exposed to *in vitro* translated [³⁵S]VHL for 1 h to determine the extent of HIF hydroxylation as a function of VHL binding. Through this assay, it was clear that exposure to R59949 augmented the capture of VHL above the basal level when the hydroxylation reaction proceeded under normoxic conditions (21%) (Fig. 5). As expected, when the same lysates were assayed in a hypoxic atmosphere (1% O₂), VHL binding was significantly reduced when compared with the relative value obtained at 21% O₂. Interestingly, R59949 increased VHL binding to the GST-HIF2 construct even under these restricted oxygen conditions. Therefore, these results indicated that R59949 treatment prevented HIF accumulation by stimulating endogenous PHD activity.

DISCUSSION

We have previously shown that the DGK inhibitor R59949 significantly inhibits the accumulation of HIF-1α protein and its activity (27). Here we show that this agent can also inhibit the accumulation of the HIF-2α isoform. Additionally, we have determined the elements of the hypoxia response pathway that are affected by this compound. The exposure of cells to R59949 does not affect the levels of HIF mRNA. However, the inhibitory influence of R59949 does require the presence of VHL, although this agent does not alter the levels of VHL protein available in a cell. Indeed, we found that R59949 abrogates the accumulation of HIF-α induced in conditions of hypoxia by increasing the binding of VHL to the hydroxylated form of HIF.

The increase of VHL-HIF binding is because of the increase in PHD activity promoted by R59949.

We have previously described that hypoxia induces an increase of the levels of phosphatidic acid in parallel with the accumulation of HIF protein (27, 37). The accumulation of both PA and HIF induced by hypoxia is abrogated by R59949 treatment. This compound has been characterized as a specific inhibitor of type I DGKs (28–30), and these enzymes have been proposed to play a role in the regulation of HIF in conditions of hypoxia (27). In the present study, we show that R59949 is a novel activator of HIF hydroxylase activity, suggesting a possible role of PA on PHD activity. Interestingly, we found that D609, a sphingomyelin synthase/phosphatidylcholine phospholipase C inhibitor that impairs hypoxia-induced PA and HIF activation (26, 38, 39), also increases the formation of VHL-HIF complexes (data not shown). This accumulation of PA might play a role in regulating the interaction between VHL and HIF. Hence, PA accumulation in conditions of hypoxia could inhibit PHD activity, contributing to HIF activation. Given that PA is a lipid second messenger critical in the response to different stimuli, such as growth factors, cytokine stimulation, etc (40–43), its potential to regulate HIF prolyl hydroxylases is an exciting possibility.

Because oxygen is a substrate for hydroxylase activity, it is possible that R59949 stimulates PHD activity by increasing the affinity of these enzymes for oxygen. At low oxygen tension (1% O₂), when the activity of these enzymes is reduced, R59949 could enhance the ability to bind the remaining molecular oxygen, thereby increasing the hydroxylation and degradation rate of HIF. Furthermore, given that the hydroxylation reaction requires different cofactors in addition to molecular oxygen, R59949 might also affect these cofactors. In this regard, the inhibition of HIF hydroxylases by transition metals, such as nickel or cobalt, may to some extent be due to the depletion of the intracellular ascorbate (44). It has also been shown that under normal tissue culture conditions, the levels of ascorbate and iron are sufficient to permit HIF hydroxylase activity. However, under the influence of certain stimuli that promote cell proliferation, such as exposure to growth factors, oncogenic transformation, etc., these cofactors become limiting. As a result, enzyme activity is reduced and HIF accumulates (45), but the addition of iron or ascorbic supplements under these conditions will restore enzyme activity. It remains to be determined whether R59949 could regulate the intracellular pools of ascorbate or iron, as well as their uptake. Thus, further studies will be necessary to fully understand the role of R59949 and these cofactors on HIF hydroxylase activity. Recently, it has been proposed that reactive oxygen species influence HIF hydroxylase activity in *junD*^{-/-} cells by promoting the oxidation of Fe(II) to Fe(III) and therefore increasing the proportion of inactive PHD in the Fe(III) oxidation state (46). Hence, according to these data, we cannot exclude that R59949 could affect the levels of ROS and that this might account for its positive effect on PHD activity. Finally, R59949 could inhibit unidentified negative regulators of PHDs. Although the regulation of PHD activity remains poorly understood, there is some evidence that novel proteins might co-operate with PHDs in the degradation of HIF (47, 48).

In the last few years, HIF-1α and -2α have been implicated in tumor progression as well as in pathological angiogenesis (49–51). HIF expression promotes cell survival in a hypoxic microenvironment, increasing the expression of proteins that regulate metabolic adaptation (glucose transporter-1, lactate dehydrogenase), resistance to apoptosis (nitric-oxide synthase-2, transforming growth factor-α), angiogenesis (vascular endothelial growth factor, transforming growth factor-β3, vas-

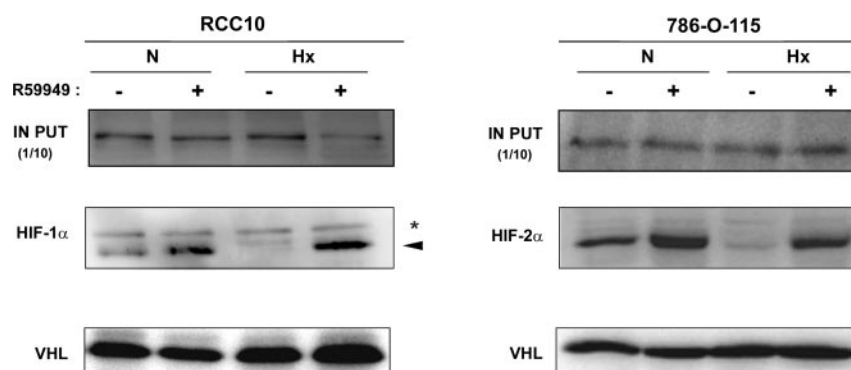


FIG. 4. **HIF-VHL complex formation is enhanced by R59949.** VHL-deficient cells, RCC10, and 786-O-(1-115) were maintained in conditions of hypoxia (Hx, 1% O₂) or kept under normoxic conditions (N, 21% O₂) for 5 h in the presence of R59949 (+; 30 μM) or vehicle (–; Me₂SO). The cell extracts were prepared in IP-lysis buffer, and the lysates were mixed with immunopurified VHL protein from 786-O-WT10 cells. The VHL-HIF complexes recovered were resolved by SDS-PAGE and analyzed by Western blot. The levels of HIF-1α and -2α bound to VHL were determined using specific antibodies (middle panels), and a 1/10 aliquot of the total extract was resolved and is shown in each case (upper panels). As a loading control for immunoprecipitations, the membranes were also probed with an anti-VHL protein antibody (lower panels). A representative experiment from four performed for each cell type is shown. *, nonspecific band; arrowheads, HIF-α.

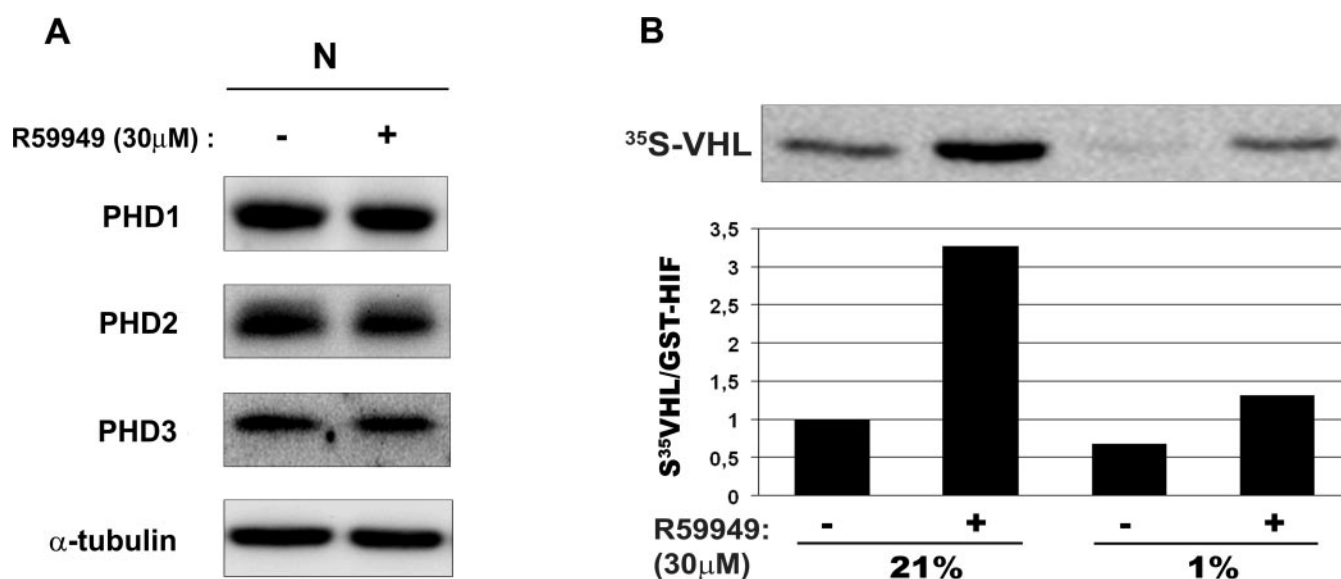


FIG. 5. **R59949 treatment induces PHD activity.** A, 786-O-WT10 cells were pretreated with 30 μM of R59949 (+) or vehicle (Me₂SO; –) for 1 h and then maintained in normoxia (N) for a further 5 h. Total cell extracts were resolved by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes to analyze the levels of PHD proteins using the antibodies indicated. As a loading control, α-tubulin was also probed in the same membranes. Similar results were obtained in three experiments, and the data shown is from a representative experiment. B, 786-O-WT10 cells were treated as described above. After treatment, the PHD activity in cell lysates was assayed at both 21 and 1% O₂, and the bound [³⁵S]VHL was determined by autoradiography (upper panel). To take into account the differences in the amount of substrate, we normalized the VHL capture to the GST-HIF2 levels in each sample. We assigned the value of 1 to the level of PHD activity obtained for normoxic lysates and that were assayed at 21% O₂. The rest of the samples were normalized to this value (lower panel). One representative experiment out of four is shown.

cular endothelial growth factor R2), and invasion and metastasis (c-MET, urokinase-type plasminogen activator receptor) (52). In addition, hypoxic cancer cells are more likely to be resistant to radiation and chemotherapy (53, 54), and therefore HIF inhibition has been proposed as a therapeutic target in these circumstances. Because PHDs are responsible for the regulation of HIF, novel anti-HIF therapies may be focused on regulating the activity of these hydroxylases (55, 56). In this regard, the effect of R59949 in stimulating these enzymes opens new possibilities for the use of this inhibitor as a therapeutic agent in cancer. One advantage of this compound is that it inhibits the stabilization of both HIF-1α and -2α with the same efficiency, and it can therefore be used to treat cells regardless the HIFα isoform expressed.

In addition to cancer therapy, R59949 could also be used in the treatment of diabetic retinopathies, pulmonary hypertension, or inflammation, pathologies where HIF up-regulation is also involved. Nevertheless, *in vivo* experiments might be

needed to validate the design of R59949-related treatments and its possible use in clinical therapies.

Acknowledgments—We thank A. Vara and Dr. L. del Peso for the GST-HIF2 construct and Dr. M. J. Calzada, Dr. L. del Peso, and Y. Cuevas for critical reading of the manuscript.

REFERENCES

- Huang, L. E., and Bunn, H. F. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 19575–19578
- Wenger, R. H. (2000) *J. Exp. Biol.* **203**, 1253–1263
- Semenza, G. (2002) *Biochem. Pharmacol.* **64**, 993–998
- Wang, G. L., Jiang, B. H., Rue, E. A., and Semenza, G. L. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 5510–5524
- Huang, L. E., Arany, Z., Livingston, D. M., and Bunn, H. F. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 32253–32259
- Kaelin, W. G., Jr. (2002) *Nat. Rev. Cancer* **2**, 673–682
- Kamura, T., Koepf, D. M., Conrad, M. N., Skowyr, D., Moreland, R. J., Iliopoulos, O., Lane, W. S., Kaelin, W. G., Jr., Elledge, S. J., Conaway, R. C., Harper, J. W., and Conaway, J. W. (1999) *Science* **284**, 657–661
- Maxwell, P. H., Wiesener, M. S., Chang, G. W., Clifford, S. C., Vaux, E. C., Cockman, M. E., Wykoff, C. C., Pugh, C. W., Maher, E. R., and Ratcliffe, P. J. (1999) *Nature* **399**, 271–275
- Huang, J., Zhao, Q., Mooney, S. M., and Lee, F. S. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**,

- 39792–39800
10. Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., Kim, W., Valiando, J., Ohh, M., Salic, A., Asara, J. M., Lane, W. S., and Kaelin, W. G., Jr. (2001) *Science* **292**, 464–468
 11. Jaakkola, P., Mole, D. R., Tian, Y. M., Wilson, M. I., Gielbert, J., Gaskell, S. J., Kriegsheim, A., Hebestreit, H. F., Mukherji, M., Schofield, C. J., Maxwell, P. H., Pugh, C. W., and Ratcliffe, P. J. (2001) *Science* **292**, 468–472
 12. Epstein, A. C., Gleadle, J. M., McNeill, L. A., Hewitson, K. S., O'Rourke, J., Mole, D. R., Mukherji, M., Metzzen, E., Wilson, M. I., Dhanda, A., Tian, Y. M., Masson, N., Hamilton, D. L., Jaakkola, P., Barstead, R., Hodgkin, J., Maxwell, P. H., Pugh, C. W., Schofield, C. J., and Ratcliffe, P. J. (2001) *Cell* **107**, 43–54
 13. Bruick, R. K., and McKnight, S. L. (2001) *Science* **294**, 1337–1340
 14. Metzzen, E., Berchner-Pfannschmidt, U., Stengel, P., Marxsen, J. H., Stolze, I., Klinger, M., Huang, W. Q., Wotzlaw, C., Hellwig-Burgel, T., Jelkmann, W., Acker, H., and Fandrey, J. (2003) *J. Cell Sci.* **116**, 1319–1326
 15. Appelhoff, R. J., Tian, Y. M., Raval, R. R., Turley, H., Harris, A. L., Pugh, C. W., Ratcliffe, P. J., and Gleadle, J. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 38458–38465
 16. Berra, E., Benizri, E., Ginouves, A., Volmat, V., Roux, D., and Pouyssegur, J. (2003) *EMBO J.* **22**, 4082–4090
 17. Masson, N., and Ratcliffe, P. J. (2003) *J. Cell Sci.* **116**, 3041–3049
 18. Hirsila, M., Koivumäki, P., Günzler, V., Kivirikko, K. I., and Myllyharju, J. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 30772–30780
 19. del Peso, L., Castellanos, M. C., Temes, E., Martin-Puig, S., Cuevas, Y., Olmos, G., and Landazuri, M. O. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 48690–48695
 20. Wenger, R. H. (2002) *FASEB J.* **16**, 1151–1162
 21. Lando, D., Peet, D. J., Whelan, D. A., Gorman, J. J., and Whitelaw, M. L. (2002) *Science* **295**, 858–861
 22. Lando, D., Peet, D. J., Gorman, J. J., Whelan, D. A., White, M. F., and Bruick, R. K. (2002) *Genes Dev.* **16**, 1466–1471
 23. Mahon, P. C., Hirota, K., and Semenza, G. L. (2001) *Genes Dev.* **15**, 2675–2686
 24. Safran, M., and Kaelin, W. G., Jr. (2003) *J. Clin. Invest.* **111**, 779–783
 25. Zhu, H., and Bunn, H. F. (2001) *Science* **292**, 449–451
 26. Temes, E., Martin-Puig, S., Aragonés, J., Jones, D. R., Olmos, G., Merida, I., and Landazuri, M. O. (2004) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **315**, 44–50
 27. Aragonés, J., Jones, D. R., Martin, S., San Juan, M. A., Alfranca, A., Vidal, F., Vara, A., Merida, I., and Landazuri, M. O. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 10548–10555
 28. Jiang, Y., Sakane, F., Kanoh, H., and Walsh, J. P. (2000) *Biochem. Pharmacol.* **59**, 763–772
 29. Sakane, F., and Kanoh, H. (1997) *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **29**, 1139–1143
 30. Flores, I., Casaseca, T., Martinez, A. C., Kanoh, H., and Merida, I. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 10334–10340
 31. Iliopoulos, O., Kibel, A., Gray, S., and Kaelin, W. G., Jr. (1995) *Nat. Med.* **1**, 822–826
 32. Krieg, M., Haas, R., Brauch, H., Acker, T., Flamme, I., and Plate, K. H. (2000) *Oncogene* **19**, 5435–5443
 33. Ivanov, S. V., Kuzmin, I., Wey, M. H., Pack, S., Geil, L., Johnson, B. E., Stanbridge, E. J., and Lerman, M. I. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 12596–12601
 34. Naranjo-Suarez, S., Castellanos, M. C., Alvarez-Tejado, M., Vara, A., Landazuri, M. O., and del Peso, L. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 31895–31901
 35. Bligh, E., and Dyer, W. (1959) *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**, 911–917
 36. Masson, N., Willam, C., Maxwell, P. H., Pugh, C. W., and Ratcliffe, P. J. (2001) *EMBO J.* **20**, 5197–5206
 37. Martin-Puig, S., Temes, E., Olmos, G., Jones, D. R., Aragonés, J., and Landazuri, M. O. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 9504–9511
 38. Luberto, C., and Hannun, Y. A. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 14550–14559
 39. Preuss, I., Kaiser, I., and Gehring, U. (2001) *Eur. J. Biochem.* **268**, 5081–5091
 40. Rizzo, M. A., Shome, K., Vasudevan, C., Stolz, D. B., Sung, T. C., Frohman, M. A., Watkins, S. C., and Romero, G. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 1131–1139
 41. Andresen, B. T., Rizzo, M. A., Shome, K., and Romero, G. (2002) *FEBS Lett.* **531**, 65–68
 42. Ktistakis, N. T., Delon, C., Manifava, M., Wood, E., Ganley, I., and Sugars, J. M. (2003) *Biochem. Soc. Trans.* **31**, 94–97
 43. Liscovitch, M., Czarny, M., Fiucci, G., and Tang, X. (2000) *Biochem. J.* **345**, 401–415
 44. Salnikow, K., Donald, S. P., Bruick, R. K., Zhitkovich, A., Phang, J. M., and Kasprzak, K. S. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 40337–40344
 45. Knowles, H. J., Raval, R. R., Harris, A. L., and Ratcliffe, P. J. (2003) *Cancer Res.* **63**, 1764–1768
 46. Gerald, D., Berra, E., Frapart, Y. M., Chan, D. A., Giaccia, A. J., Mansuy, D., Pouyssegur, J., Yaniv, M., and Mechta-Grigoriou, F. (2004) *Cell* **118**, 781–794
 47. Jeong, J. W., Bae, M. K., Ahn, M. Y., Kim, S. H., Sohn, T. K., Bae, M. H., Yoo, M. A., Song, E. J., Lee, K. J., Kim, K. W. (2002) *Cell* **111**, 709–720
 48. Baek, J. H., Mahon, P. C., Oh, J., Kelly, B., Krishnamachary, B., Pearson, M., Chan, D. A., Giaccia, A. J., and Semenza, G. L. (2005) *Mol. Cell* **17**, 503–512
 49. Semenza, G. L. (2000) *J. Appl. Physiol.* **88**, 1474–1480
 50. Semenza, G. L. (2001) *Trends Mol. Med.* **7**, 345–350
 51. Bruick, R. K. (2003) *Genes Dev.* **17**, 2614–2623
 52. Semenza, G. (2003) *Nat. Rev. Cancer* **3**, 721–732
 53. Um, J. H., Kang, C. D., Bae, J. H., Shin, G. G., Kim, W., Kim, D. W., Chung, B. S., and Kim, S. H. (2004) *Exp. Mol. Med.* **36**, 233–242
 54. Semenza, G. L. (2004) *Cancer Cell* **5**, 405–406
 55. Warnecke, C., Griethe, W., Weidemann, A., Jurgensen, J. S., Willam, C., Bachmann, S., Ivashchenko, Y., Wagner, I., Frei, U., Wiesener, M., and Eckardt, K. U. (2003) *FASEB J.* **17**, 1186–1188
 56. Schlemminger, I., Mole, D. R., McNeill, L. A., Dhanda, A., Hewitson, K. S., Tian, Y. M., Ratcliffe, P. J., Pugh, C. W., and Schofield, C. J. (2003) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **13**, 1451–1454